Die Bedeutung der RNSpolymerase-Bindungsstelle für die Initiation der RNS-Synthese

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Biologie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Bertold Heyden
aus Aschersleben

1974

74 460

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546514_0068

Die Bedeutung der RNSpolymerase-Bindungsstelle für die Initiation der RNS-Synthese

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Biologie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Bertold Heyden

aus Aschersleben

1974

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 2. August 1974

Dekan: Professor Dr. D. Sperlich

1. Berichterstatter: Professor Dr. A. Gierer

2. Berichterstatter: Professor Dr. W. Seyffert

FOTODRUCK PRÄZIS Barbara v. Spangenberg KG · Tübingen

INHALT

1 EINLEITUNG 7

2 ERGEBNISSE 13

2.1 Das in vitro System 13
.11 fdRF als Template der Transkription 13
.12 Die Spezifität der RNS-Synthese am fdRF-Template 14

2.2 Korrelation von Bindungsstelle und Start der RNS-Synthese 18

2.3 RNS-Synthese aus dem RNSpolymerase-pDNS-Komplex 20
.31 Nachweis von pRNS 21
.32 Spezifität der pRNS 24

2.4 Sequenz der pRNS 28
.41 Methode der Sequenzanalyse 28
.41.1 Trennung der Oligonukleotide 28
.41.2 Sequenzanalyse der Oligonukleotide 32
.42 Präparative Isolierung der pRNS 33
.43 Teilsequenzen nach RNase-Abbau der pRNS 35
.43.1 Fragmente nach Pankreas-RNase-Spaltung 38
.43.2 Fragmente nach T_1-RNase-Spaltung 41
.43.3 Anordnung der Teilsequenzen 43
.44 Das Startoligonukleotid 44
.44.1 Das Startoligonukleotid von (-CTP)RNS 45
.44.2 Das Startoligonukleotid von pRNS 47
.45 Gesamtsequenz der pRNS 49

2.5 Startsequenz von fdRF-transkribierter RNS (Sequenzvergleich mit pRNS) 50
.51 Aussagekraft des Sequenzvergleichs 51
.52 Startsequenz von fdRF-transkribierter RNS (RF-RNS) 53
.52.1 Isolierung kurzer RNS-Ketten 53

.52.2 Sequenzanalyse 54
.53 Identität des Startpunktes von RF-RNS und pRNS 58

3 ZUSAMMENFASSUNG 62

4 DISKUSSION 64

5 MATERIAL UND METHODEN 71

5.1 Puffer 71

5.2 Material 71

5.3 Radioaktives Material 71

5.4 Radioaktive Messungen 73

5.5 Enzyme 73
.51 RNSpolymerase 73
.52 DNSpolymerase 73
.53 Polynukleotidligase 74
.54 DNase I 74
.55 RNase 74
.56 Alkalische Phosphatase 74
.57 Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase und Phosphoglyceratkinase 74

5.6 Nukleinsäuren 74
.61 fd-DNS 74
.62 Minus-fd-DNS 75
.63 fdRF 75
.64 pDNS, Plus- und Minusstrang 76
.65 Thymus-DNS und Hefe-RNS 77
.66 c-RNS 77

5.7 RNS-Synthese und präparative Isolierung 77
.71 Vorinkubation und Synthese von RF-RNS, (-CTP)RNS und pRNS 77
.72 Sequenzheterogene RNS 78

.73	Alkoholfällung	78
.74	Präparative Isolierung von pRNS und RF-RNS zur Sequenzanalyse	78
5.8	Charakterisierung der RNS-Synthese an fdRF als Template	79
.81	Asymmetrie der Transkription	79
.82	Templateaktivität des fdRF	80
.83	Startnukleotid bei niedrigem RNSpolymerase/fdRF-Verhältnis	80
5.9	Charakterisierung von pRNS	80
.91	Gelelektrophorese	80
.92	Hybridisierung	81
.93	Startnukleotid	81
5.10	Sequenzanalyse	81
.101	Trennung der Oligonukleotide	81
.101.1	RNase-Abbau	81
.101.2	Zweidimensionale PEI-Chromatographie	82
.101.3	Chromatographie des Startoligo-nukleotids	83
.102	Analyse der Oligonukleotide	84
.102.1	Phosphatase	84
.102.2	Basenanalyse	85
.102.3	RNase	85
5.11	Abkürzungen	87
6	LITERATUR	89

1. EINLEITUNG

Die Voraussetzung für die Proteinsynthese in der Zelle ist die Transkription der in der DNS festgelegten genetischen Information in Messenger-RNS (mRNS). Die Transkription der DNS erfolgt abschnittweise entsprechend einzelnen Genen oder Gengruppen. Dabei wird die RNS komplementär zu nur einem Strang des DNS-Doppelstranges synthetisiert.

Für die bakterielle Transkription wurde 1961 von Jacob und Monod (1) ein Operonmodell entwickelt, das die Regulation der Transkription eines bestimmten DNS-Abschnittes beschreibt. Das Operon enthält neben den Strukturgenen den Operator, einen DNS-Bereich, der deren Transkription kontrolliert. In der Weiterentwicklung des Modells wurde innerhalb dieses regulatorisch wirkenden DNS-Bereiches der Promoter vom Operator unterschieden. Der Promoter tritt mit dem transkribierenden Enzym, der RNSpolymerase, in Wechselwirkung, so daß die mRNS-Synthese eingeleitet wird (2). Promotermutationen haben dementsprechend einen Einfluß auf die Effektivität der Transkription der Strukturgene eines Operons.

Im allgemeinen kontrollieren die dem Promoter benachbarten DNS-Bereiche dessen Funktionsbereitschaft durch ihre Wechselwirkung mit anderen Proteinfaktoren (z.B. der Operator durch seine Wechselwirkung mit dem Repressor im

ursprünglichen Modell von Jacob und Monod). Im einfachsten Falle wird aber die Initiation der RNS-Synthese nur durch die Wechselwirkung der RNSpolymerase mit dem Promoter bedingt, wie es bei der Transkription der "frühen" Gene der virulenten Bakteriophagen verwirklicht zu sein scheint.

Die Initiation der mRNS-Synthese ist ein Vorgang von hoher Spezifität. Die Wechselwirkung der RNSpolymerase mit der Promoter-DNS führt zur Auswahl einer innerhalb der DNS-Nukleotidsequenz genau festgelegten Startstelle und zur Auswahl des Sinnstranges bzw. der Syntheserichtung. Es stellt sich die Frage nach den molekularen Mechanismen dieser Spezifität. Ihre Beantwortung muß letztlich dazu führen, die Eigenschaft des Promoters auf die Besonderheit seiner Nukleotidsequenz zu reduzieren.

Experimentell lassen sich die Reaktionen der RNSpolymerase an der Template-DNS in zwei Teilreaktionen zergliedern: 1. das Binden des Enzyms an die DNS und 2. die Initiation der RNS-Synthese durch Zugabe der Ribonukleosidtriphosphate. Es zeigt sich, daß die RNSpolymerase zu wenigen Stellen der DNS eine besonders hohe Affinität besitzt (3,4). Die stabilen RNSpolymerase-DNS-Komplexe, die sich an diesen spezifischen Bindungsstellen bilden, sind durch ihre Kältesensitivität und die Notwendigkeit der Beteiligung der σ-Untereinheit der RNSpolymerase in diesem Komplex ausgezeichnet.

Die gleichen Charakteristika gelten analog für die Initiation der RNS-Synthese. An der Auswahl einer spezifischen Startstelle ist die σ-Untereinheit beteiligt (5, 6).Die scharfe Temperaturabhängigkeit der RNS-Synthese wurde zuerst von Walter et al. (7) mit der Modellvorstellung des Denaturierens der DNS im Initiationskomplex in Zusammenhang gebracht.

Der Initiation der RNS-Synthese muß selbstverständlich das Binden der RNSpolymerase an die DNS vorausgehen, aber es konnte bisher nicht mit Sicherheit nachgewiesen werden, daß die gemessene stabile Bindung die Vorbedingung der spezifischen Initiation ist. Andererseits ist die Analogie der Bedingungen für beide Reaktionen offensichtlich und die Schlußfolgerung sinnvoll, daß die spezifische und stabile Bindung ein Teilschritt der Gesamtreaktion ist, die zur Initiation der Transkription führt. Als einfachste Vorstellung ergibt sich daraus das folgende Promotermodell: Die RNSpolymerase hat auch in Abwesenheit der Ribonukleosidtriphosphate eine hohe Affinität zu den wenigen spezifischen Initiationsstellen des DNS-Templates. Die sich bildenden stabilen Komplexe bedingen durch ihre Spezifität unmittelbar die Spezifität der Initiation. Die Bindungsstelle sollte demnach mit der Initiationsstelle identisch sein, oder zumindest in enger Nachbarschaft dazu liegen.

Nun konnten aber Blattner et al. (8,9) eine Promotermutation in relativ großer Entfernung vom Startpunkt der RNS-Synthese lokalisieren, so daß eine Wechselwirkung der mutierten DNS mit der an der Initiationsstelle gebundenen RNSpolymerase ausgeschlossen ist. Es wurde in diesem Zusammenhang ein Driftmodell postuliert, wonach das Erreichen der Initiationsstelle durch die RNSpolymerase von einem größeren DNS-Bereich beeinflußt wird, als einer Bindungsstelle entspricht. Andere Autoren (10) nehmen vor der eigentlichen Startstelle "storage sites" an, an die mehrere Polymerase-Moleküle gebunden werden, und von denen aus sie die Initiationsstelle erreichen. Demnach sind Binden und Initiieren möglicherweise physikalisch nicht so eng korreliert wie nach der oben zitierten einfachen Modellvorstellung.

Unser Interesse war daher, die Beziehung zwischen dem Binden der RNSpolymerase und ihrer spezifischen Initiation der RNS-Synthese zu untersuchen. Insbesondere sollte geklärt werden, ob die Initiationsstelle mit der Bindungsstelle "räumlich" zusammenfällt. Die Bindungsstelle ist die DNS, die von der RNSpolymerase im Zustand der stabilen Bindung abgedeckt wird und dadurch DNase-resistent bleibt. Entsprechend bezeichnen wir als Initiationsstelle die DNS, die bei der Initiation der RNS-Synthese, also der sequenzspezifischen Anlagerung des ersten Ribonukleosidtriphosphats von der RNSpolymerase abgedeckt wird.

Zur Untersuchung dieser Fragen im in vitro System der Transkription wurde als Template die Replikative Form (fdRF) des virulenten Phagen fd gewählt. Beim Studium der Bindung der RNSpolymerase an diese DNS (11,12) zeigt es sich, daß unter limitierenden Polymerasekonzentrationen bevorzugt nur eine Bindungsstelle besetzt wird. Bei der gewählten Ionenstärke hat der gebildete RNSpolymerase-fdRF-Komplex eine Halbwertszeit des Zerfalls von mehreren Stunden. Durch DNase-Abbau der fdRF-DNS, die nicht von der RNSpolymerase geschützt wird, läßt sich die DNS der Bindungsstelle isolieren. Dieses DNS-Fragment, genannt pDNS, hat eine Länge von ca. 40 Nukleotiden. Der Plusstrang ist um etwa 4 Nukleotide länger als der Minusstrang, wahrscheinlich auf Grund einer asymmetrischen Bindung der RNSpolymerase.

Als Zwischenprodukt der pDNS-Isolierung bildet sich der RNSpolymerase-pDNS-Komplex, in dem die pDNS vor DNase-Abbau geschützt ist. Sie wird aber DNase-sensitiv, wenn die vier Ribonukleosidtriphosphate zugegeben werden (11). Dieser Befund unterstützt die Annahme, daß die RNSpolymerase-Bindungsstelle in direkter Beziehung zur Transkription steht, beweist aber noch nicht, daß der Startpunkt innerhalb der Bindungsstelle liegt; so ist beispielsweise eine nur allosterische Wirkung der Triphosphate im Sinne des Auslösens einer Drift entlang der DNS nach dem Modell von Blattner et al. ebenfalls denkbar.

In der folgenden Arbeit wird gezeigt, daß das Entlassen der RNSpolymerase von der pDNS tatsächlich die Folge von RNS-Synthese aus dem RNSpolymerase-pDNS-Komplex ist. Durch Sequenzanalyse dieser RNS und Nachweis der Identität dieser Sequenz mit der Startsequenz von RNS, die in vitro von fdRF-DNS transkribiert wurde, wird nachgewiesen, daß der Initiationspunkt der Transkription innerhalb der Bindungsstelle liegt, so daß damit für fdRF das einfache, ursprünglich angenommene Promotermodell gültig ist.

2. ERGEBNISSE

2.1 Das in vitro System

2.11 fdRF als Template der Transkription

Zur biochemischen Analyse der Funktionen des Promoters sollte ein in vitro System vorhanden sein, in dem im Idealfall nur ein einziges Operon aktiv ist, und in dem möglichst wenig unspezifische RNS-Synthese stattfindet. Wie im folgenden gezeigt wird, erfüllt die ringförmige Replikative Form des Phagen fd, eine mit ca. 6 000 Nukleotidpaaren sehr kleine DNS, diese Bedingungen.

Die Replikative-Form-DNS wurde in vitro mit Hilfe der E.coli-Enzyme DNSpolymerase I und Polynukleotidligase ausgehend von der aus dem Phagen isolierten einzelsträngigen fd-DNS synthetisiert (13,14). Dies hat gegenüber der Isolierung der Replikativen Form aus den infizierten Bakterien methodische Vorteile: Die Replikative-Form-DNS läßt sich aus dem Ausgangsprodukt, der fd-DNS, leicht in großen Mengen erhalten und kann hierbei (z.B. für die Analyse der pDNS) in beiden Strängen selektiv radioaktiv markiert werden.

Die enzymatisch synthetisierte Replikative Form des Phagen fd (im folgenden als fdRF bezeichnet) ist wie aus infizierten E.coli-Zellen isolierter RF I in beiden Strängen kovalent zum Ring geschlossen, besitzt aber keine Su-

perhelix-Struktur. Es ist nicht bekannt, ob in vivo die superhelikale Form (RF I), die entspannte Form (RF II), oder möglicherweise ein durch Assoziation mit Proteinen entspannter RF I als Template der Transkription dienen. Deshalb kann nicht von vornherein dem in vitro synthetisierten fdRF oder einer der in vivo vorkommenden Formen des RF der Vorzug für die Eignung in einem in vitro System der Transkription zugesprochen werden.

2.12 Die Spezifität der RNS-Synthese am fdRF-Template

Es soll im folgenden die Spezifität der RNS-Synthese am fdRF-Template diskutiert werden, auch um dem Einwand zu begegnen, daß die besondere physikalische Struktur des fdRF möglicherweise die Synthese artifizieller RNS-Produkte bewirke.

Die Gültigkeit der Aussagen aus in vitro Versuchen über die Initiation der RNS-Synthese für die in vivo Transkription kann streng genommen nur mit Hilfe von Promotermutanten nachgewiesen werden, die in vivo und in vitro vergleichbare Wirkungen auf die Transkription haben. Auf biochemischem Niveau spricht andererseits der Nachweis einer hohen Spezifität der in vitro Reaktion für die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die in vivo Verhältnisse. Von fd sind keine Promotermutanten bekannt, deshalb wird hier das in vitro System nur biochemisch beschrieben.

Template der RNS-Synthese	eingesetzte RNS	filtergebundene RNS nach Hybridisierung mit					
		fd-DNS		Minus-fd-DNS		(ohne DNS)	
	cpm %	cpm	%	cpm	%	cpm	%
fdRF-DNS	1220 100	10	0.8	1208	99	8	0.7
fd-DNS	7500 100	6870	92	174	2.3	70	0.9

Tabelle 1: Asymmetrie der in vitro-Transkription von fdRF.

An fdRF-DNS als Template wurde RNS synthetisiert und dabei mit [^{3}H]UTP radioaktiv markiert. Diese RNS, sowie im Kontrollversuch [^{3}H]c-RNS, synthetisiert an fd-DNS als Template, wurden mit fd-DNS und der dazu komplementären Minus-fd-DNS hybridisiert. Das Hybrid wurde durch Filtration an Nitrocellulose-Membranfilter gebunden.

Mit fdRF I als Template führt die in vitro RNS-Synthese zu spezifischen Transkriptionsprodukten (15), wobei vier RNS-Spezies mit unterschiedlichen Starttripletts gefunden werden. Die Synthese verläuft asymmetrisch (16, 5), und zwar dient der Minusstrang[1] des fdRF I als Template, so wie es auch für die in vivo Transkription gefunden wurde (17).

1) Minusstrang: der zu fd-DNS (Plusstrang) komplementäre Strang.

Entsprechend konnte für den synthetischen fdRF eine hohe Spezifität nachgewiesen werden. Seine Transkription verläuft vollständig strangselektiv in der geforderten Weise (Tabelle 1). Ein unspezifischer Start an Enden oder Einzelstrangbrüchen der DNS (die fdRF-Präparation enthält bis zu 10 % nicht ringförmiges Material) ist damit ausgeschlossen.

Die Templateaktivität des fdRF ist für das RNSpolymerase-Holoenzym etwa sechs mal so hoch wie für das Coreenzym, dem die σ-Untereinheit fehlt (Fig.1). Es ist bekannt, daß die σ-Untereinheit des Enzyms in vitro für spezifische Initiationsstellen selektiert (5,6). Die Stimulierung der RNS-Synthese an fdRF durch die -Untereinheit bedeutet, daß an diesem Template spezifische Initiationsstellen erreichbar sind. Sugiura et al. (5) fanden unter vergleichbaren Bedingungen eine relativ hohe Syntheserate an fdRF I für das Coreenzym, verknüpft mit unspezifischer Initiation und eine entsprechend geringere Stimulierung der Synthese durch Zugabe von σ-Faktor. Der Unterschied ist wahrscheinlich auf die latent vorhandenen Einzelstrangbereiche in fdRF I zurückzuführen, die dem Coreenzym als Bindungs- und Initiationsstellen dienen können. Die Versuche von Botchan et al. (18) mit ringförmiger λ-DNS weisen in die gleiche Richtung: Überschüssige negative Windungen, die zu einem gleichsinnigen Twist wie in RF I führen, verringern die Spezifität der Wechselwirkung mit RNSpolymerase.

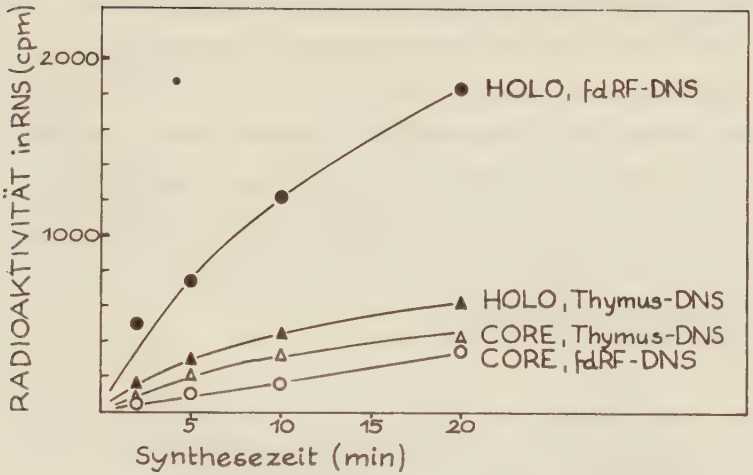


Fig.1: Template-Aktivität von fdRF für RNSpolymerase Core- und Holoenzym

Bei gleichen Konzentrationen von fdRF-DNS (—●—○—) oder Thymus-DNS (—▲—△—) wurde nach Binden äquivalenter Mengen RNSpolymerase Holoenzym (—●—▲—) bzw. Coreenzym (—○—△—) die Kinetik der RNS-Synthese durch Einbau von [^{3}H]UTP gemessen.

Insofern vereinigt der synthetische fdRF die positiven Eigenschaften von RF I und RF II, da die Möglichkeiten der unspezifischen Bindung und Initiation sowohl an Einzelstrangbrüchen oder -lücken (RF II) als auch an latent denaturierten Regionen (RF I) ausgeschlossen sind. Sicher kann eingewendet werden, daß der fdRF die in vivo Situation in vitro nicht exakt wiedergibt; zum Beispiel wäre denkbar, daß sich die relative Affinität der verschiede-

nen Promotoren zueinander mit der Stärke des Twists verändert, bzw. daß die Besetzung einer Bindungsstelle die Affinität einer zweiten herabsetzt, weil das Denaturieren der Stränge dort erschwert wird. Dennoch kann angenommen werden, daß die an fdRF zu beobachtende Transkription, auch wenn sie nur einem Ausschnitt der in vivo Situation entspricht, diesen bezüglich seiner Spezifität der Initiation richtig wiedergibt.

2.2 Korrelation von Bindungsstelle und Start der RNS-Synthese

Wenn zum in vitro System der Transkription keine Ribonukleosidtriphosphate hinzugefügt werden, läßt sich das Binden der RNSpolymerase an die Template-DNSals isoliertes Phänomen untersuchen. Es hat sich gezeigt, daß die stabile Bindung an wenigen genau definierten Stellen erfolgt. Dies geht sowohl aus elektronenmikroskopischen Bildern hervor, als auch aus der Möglichkeit, diese Bindungsstelle als DNS-Fragment mit definierter Sequenz zu isolieren. Alternativ wäre eine Bindung ohne festen Ort mit der Möglichkeit einer Drift entlang der DNS vorstellbar.

Nach Zugabe der Ribonukleosidtriphosphate werden RNS-Spezies mit definierten Startsequenzen synthetisiert. Die Vorstellung erscheint sinnvoll (ist aber nicht zwingend),

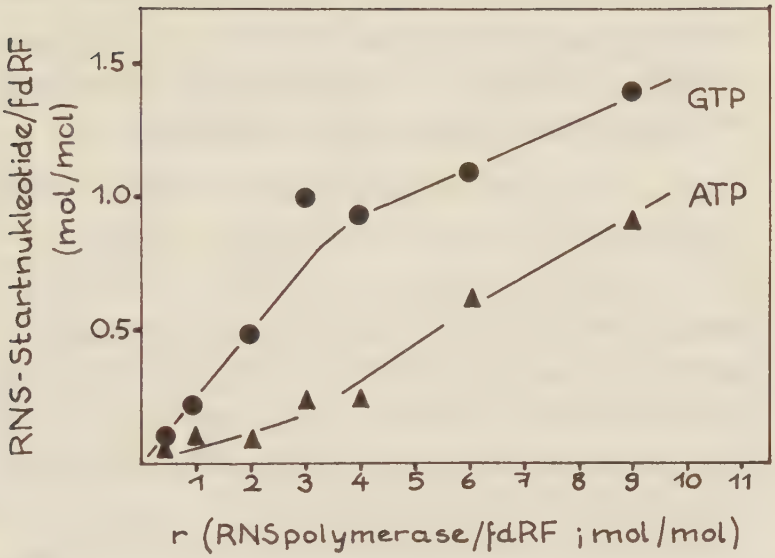


Fig.2: Startnukleotid der RNS bei niedrigem RNSpolymerase/fdRF-Verhältnis.

RNSpolymerase wurde im angegebenen Molverhältnis mit fdRF vorinkubiert. Zur RNS-Synthese (10 min, 37°C) waren ATP mit ^{33}P (—▲—) und GTP mit ^{32}P (—●—) in der γ-Position radioaktiv markiert. Nach 2 min Synthesezeit wurde Rifampicin zur Inaktivierung freiwerdender RNSpolymerase zugegeben.

daß einer bestimmten Bindungsstelle eine bestimmte RNS-Spezies zugeordnet werden kann. Eine solche Parallelität wird für fdRF gefunden: Werden steigende Mengen RNSpolymerase zu fdRF gegeben, so werden sequenziell verschiedene Bindungsstellen besetzt, so daß es möglich war, die erste in etwa 80-prozentiger Reinheit zu isolieren (11).

Ganz entsprechend werden bei niedrigem RNSpolymerase/fdRF-Verhältnis die synthetisierten RNS-Ketten bevorzugt mit GTP gestartet (Fig.2). Der zuerst besetzten Bindungsstelle ist also ein Synthesestart mit GTP zuzuordnen.

Wie C.Nüßlein (12) zeigen konnte, läßt sich der RNSpolymerase-Komplex an der bevorzugten Bindungsstelle durch Zugabe von GTP gegen Erhöhung der Salzkonzentration und Temperaturerniedrigung auf $0^{\circ}C$ stabilisieren. Diese Stabilisierung beruht auf der Synthese einer Oligo-G-Kette, wobei die Polymerase ihre Position auf der Bindungsstelle unverändert beibehält. Dies ist ein Hinweis dafür, daß Bindungsstelle und Initiationsstelle physikalisch nicht voneinander zu trennen sind, falls die Annahme richtig ist, daß die Oligo-G-Synthese am Startpunkt der Transkription stattfindet.

2.3 RNS-Synthese aus dem RNSpolymerase-pDNS-Komplex

Wenn der Startpunkt der Transkription innerhalb der RNSpolymerase-Bindungsstelle liegt, sollte es vielleicht möglich sein, nach Binden der RNSpolymerase an fdRF und nach DNase-Abbau der ungeschützten fdRF-DNS, RNS-Synthese aus dem verbleibenden RNSpolymerase-pDNS-Komplex nachzuweisen. Die DNase-Sensitivität der pDNS, bedingt durch ihr Freiwerden aus diesem Komplex bei Zugabe der vier Ribonukleosidtriphosphate, läßt sich jedenfalls als Folge

von RNS-Synthese zwanglos erklären. Alle folgenden Versuche wurden bei einem Verhältnis von zwei RNSpolymerasemolekülen pro fdRF ausgeführt. Unter diesen Bedingungen wird bevorzugt nur eine Bindungsstelle besetzt und GTP-gestartete RNS synthetisiert (vgl. Fig. 2).

2.31 Nachweis von pRNS

Tatsächlich ließ sich RNS-Synthese aus dem RNSpolymerase-pDNS-Komplex nachweisen: Nach Bildung des RNSpolymerase-fdRF-Komplexes und nach DNase-Abbau wurden die Ribonukleosidtriphosphate zugegeben und nach fünfzehnminütiger Inkubation das Reaktionsprodukt nach Alkoholfällung mittels Acrylamid-Gelelektrophorese analysiert (Fig.3,A). Neben den Banden des unvollständig abgetrennten Triphosphats finden sich eine RNS-Bande mit einer relativen Mobilität von 0.85 bis 0.9 (im Vergleich zu Bromphenolblau) und im allgemeinen eine davon abgesetzte Bande bei einer relativen Mobilität von 1.03. Die Kettenlängen dieser RNS liegen unter einer Länge von 20 Nukleotiden (vgl. Eichkurve, Ref.11).

Die kürzere Spezies (rel. Mobilität 1.03) findet sich auch in RNS-Präparationen, die an fdRF synthetisiert werden (Fig.3,B). Eine RNS gleicher Länge (das heißt gleicher relativer Mobilität in der Gelelektrophorese) läßt sich nachweisen, wenn an fdRF als Template unter Ausschluß von

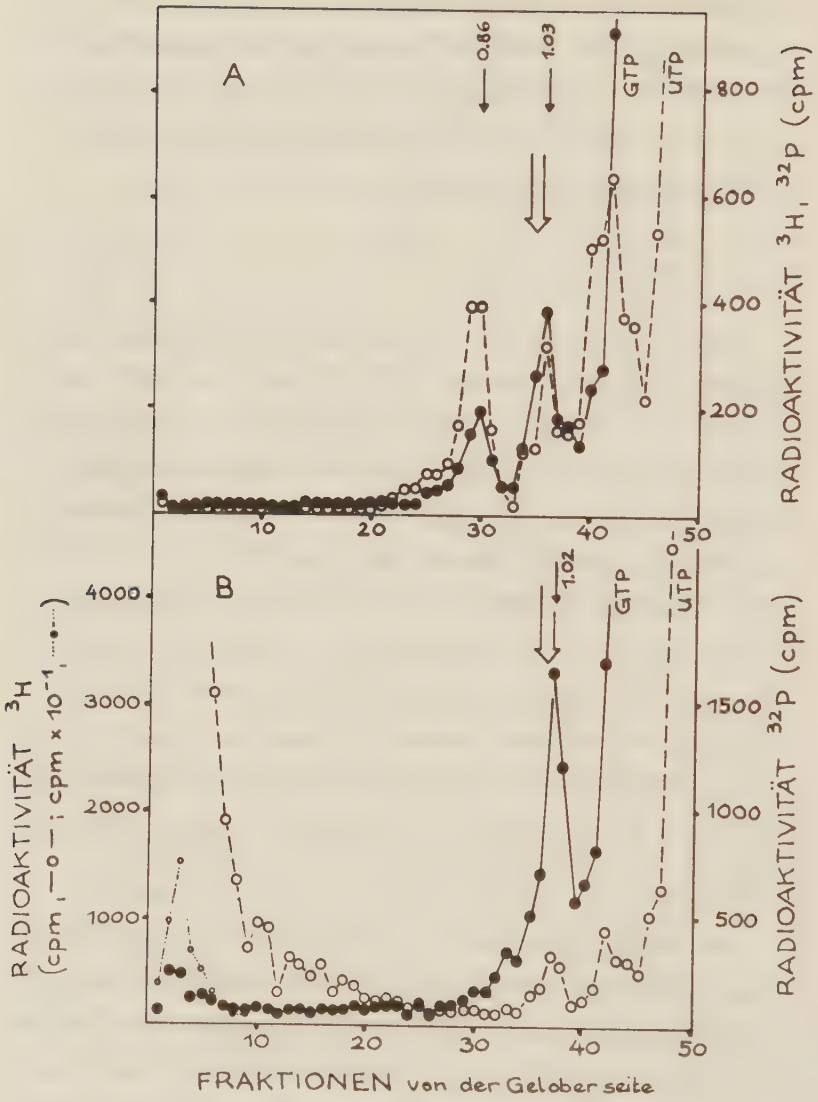


Fig.3: Gelelektrophorese von pRNS (A) und RF-RNS (B).

CTP, aber sonst gleichen Bedingungen RNS synthetisiert wird. Diese sogenannte (-CTP)RNS wird in relativ hohen Ausbeuten erhalten (10 - 20 Kopien pro fdRF). Wie sich aus den Daten der Sequenzanalyse (vgl. die Kapitel 2.4 und 5) ergibt, ist es sehr wahrscheinlich, daß ihr Startpunkt mit dem von RNS, die in Anwesenheit aller vier Triphosphate an fdRF synthetisiert wird, identisch ist. Der erste CMP-Rest steht in Position acht der Nukleotidsequenz (vgl. Kapitel 2.5). Der frühe Kettenabbruch,der zu der kurzen RNS-Spezies (rel. Mobilität 1.03) führt, sollte demnach etwa bei Position sieben stattfinden. Ob dieser Kettenabbruch irgendeine physiologische Bedeutung hat, oder nur ein Artefakt der in vitro Synthese darstellt, wurde nicht weiter untersucht.

Dagegen tritt die längere RNS-Spezies (rel. Mobilität 0.85 bis 0.9) bei Synthese am fdRF-Template nicht auf. Sie ist das charakteristische Syntheseprodukt des RNSpolymerase-

---

Fig.3: Gelelektrophorese von pRNS (A) und RF-RNS (B).

pRNS und RF-RNS wurden ausgehend von 0.4 pmol (A) bzw. 0.09 pmol (B) fdRF-Molekülen synthetisiert. Synthesezeit jeweils 15 min bei 37°C. Die spezifischen Aktivitäten des radioaktiven Substrats waren 11 Ci/mmol $[^3H]$UTP (—o—) und 7×10^9 cpm/µmol (A) bzw. 13×10^9 cpm/µmol (B) $[\gamma^{32}P]$GTP (—●—). Das Syntheseprodukt wurde nach Alkoholfällung auf das Gel aufgetragen. Die geraden Pfeile markieren die Laufstrecke der RNS in Relation zu Bromphenolblau (offener Pfeil).

pDNS-Komplexes, und wird im folgenden in Anlehnung an das pDNS-Template als pRNS bezeichnet.

Die Ausbeuten der insgesamt aus dem Komplex synthetisierten RNS sind in den einzelnen Versuchen unterschiedlich hoch. Sie erreichen in den präparativen Ansätzen 50 - 60 % des theoretischen Wertes (Startausbeute bezogen auf eingesetzten fdRF).

2.32 Spezifität der pRNS

Der Wanderungsgeschwindigkeit von pRNS entspricht eine Kettenlänge zwischen 10 und 20 Nukleotiden. Dies sollte gerade ausreichen, um diese RNS unter milden Bedingungen gegen die isolierten Stränge von pDNS zu hybridisieren, und um so die geforderte Strangselektivität zu prüfen. Die gesamte aus dem Komplex synthetisierte RNS wurde nach Alkoholfällung mit den getrennten Strängen sowohl von pDNS als auch von fdRF hybridisiert, und das Hybridisierungsprodukt mittels Gelfiltration analysiert (Fig.4). Die Radioaktivität der RNS erscheint nach erfolgter Hybridisierung in der Position von pDNS bzw. fd-DNS. Es zeigt sich, daß etwa 80 % der hybridisierbaren Ketten strangspezifisch jeweils mit dem Minusstrang hybridisieren[2].

---

2) Frühere Versuche langkettige RNS mit pDNS zu hybridisieren, lieferten dagegen keine reproduzierbaren Ergebnisse, möglicherweise wegen der kompetitiven Wirkung der RNS-Kette selbst durch Ausbildung von Sekundärstrukturen bei den notwendigen niedrigen Hybridisierungstemperaturen.

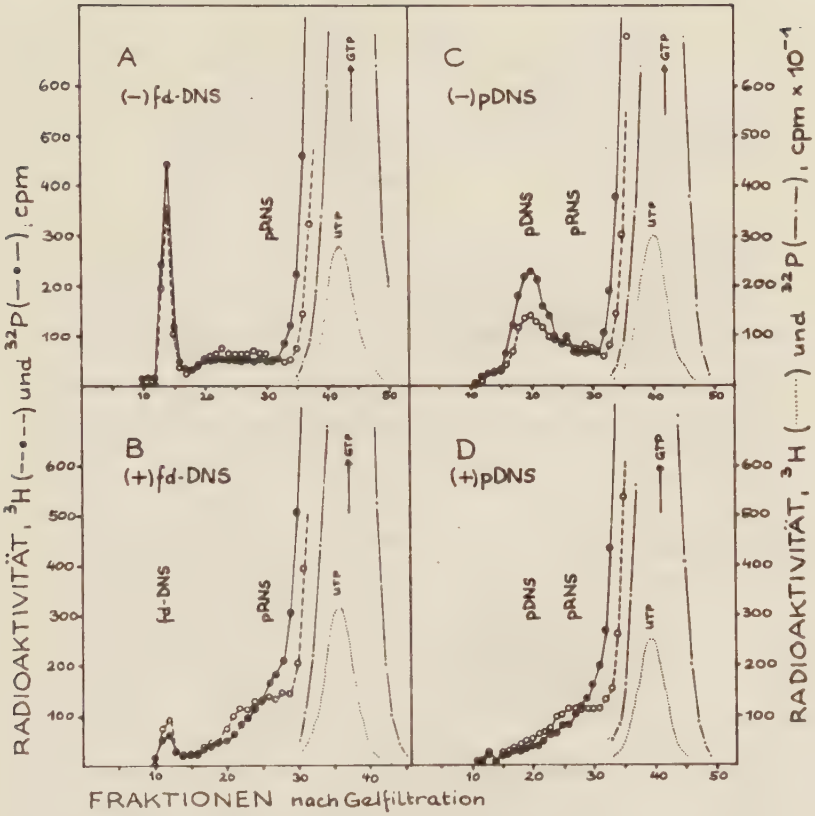


Fig.4: Strangselektivität der pRNS-Synthese.

pRNS wurde während der Synthese (15 min, 37°C) mit [γ^{32}P] GTP, 3×10^{10} cpm/µmol und [^{3}H]UTP, 11 Ci/mmol, markiert. Nach Alkoholfällung wurde die RNS in Lösung mit fd-DNS (B), Minus-fd-DNS (A) und den getrennten Strängen von pDNS (C und D) hybridisiert. Die Hybridisierungsprodukte wurden durch Gelfiltration auf Sephadex G 75 analysiert (^{3}H-Markierung: — o —; ^{32}P-Markierung: — ● —).

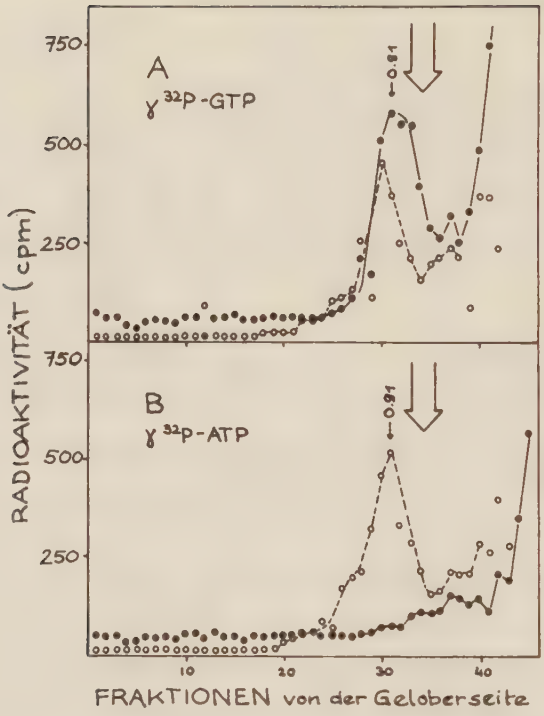


Fig.5: Startnukleotid von pRNS

pRNS wurde in der Kette mit [^{3}H]UTP (—o—) und im Startnukleotid alternativ mit [γ^{32}P]GTP bzw. [γ^{32}P]ATP (—•—) radioaktiv markiert (vgl. Material und Methoden 5.93). Fig. 5 zeigt die Analyse der Reaktionsprodukte mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese (der offene Pfeil gibt die Position des Bomphenolblau an).

Wenn alternativ ^{32}P-ATP oder ^{32}P-GTP zur Markierung des Startnukleotids angeboten wird, zeigt es sich, daß nur GTP als Startnukleotid dient (Fig. 5). In beiden Versuchen ergibt sich eine gleichartige Spezifität wie die von fdRF-transkribierter RNS.

Diese Ergebnisse und die Tatsache, daß ein großer Teil der RNSpolymerase-pDNS-Komplexe überhaupt fähig ist, RNS zu synthetisieren, führt zu der Annahme, daß die Initiationsstellen von pRNS und fdRF-transkribierter RNS miteinander identisch sind. Insofern wäre also die pRNS als echtes Transkriptionsprodukt der pDNS anzusehen.

Es bleibt noch ein Einwand bezüglich der Interpretation der Ergebnisse: Es wäre auch denkbar, daß der normale Transkriptionsstart an intakter fdRF-DNS außerhalb der Bindungsstelle liegt, daß sich nur die gleichartige Strangspezifität der Transkription und der pRNS-Synthese jeweils als Folge der Asymmetrie des Bindungskomplexes ergibt. Der Beweis der Identität der Initiationsstellen von pRNS und fdRF-transkribierter RNS wird durch Vergleich der RNS-Sequenzen (in Kapitel 2.4 und 2.5) geliefert.

2.4 Sequenz der pRNS

Die Sequenzanalyse der pRNS gibt einerseits die Möglichkeit, im Vergleich mit der pDNS-Sequenz, den Initiationspunkt innerhalb dieser Sequenz festzulegen - um so vielleicht zwischen DNS-Sequenz und Initiation der RNS-Synthese eine Beziehung zu finden. Andererseits kann im Vergleich mit der Startsequenz von fdRF-transkribierter RNS (kurz RF-RNS genannt), die Identität dieser Sequenzen gezeigt (vgl. Kapitel 2.5), und damit die Identität ihrer Startstellen nachgewiesen werden.

2.41 Methode der Sequenzanalyse

2.41.1 Trennung der Oligonukleotide

Das Prinzip der Sequenzanalyse von RNS basiert auf dem Zerschneiden der RNS-Sequenz mit spezifisch wirkenden Nukleasen: Pankreas-RNase schneidet nach Uridin und Cytidin, T_1-RNase nach Guanosin, durch Hydrolyse der Phosphorsäureesterbindung des (in 3'-Richtung) benachbarten Nukleotids. Die entstehenden Oligonukleotide werden chromatographisch getrennt und ihre Sequenzen einzeln analysiert. Die Reihenfolge der Einzelsequenzen läßt sich auf Grund ihrer Nachbarschaftsbeziehungen und wegen der Überlappung der von Pankreas-RNase und T_1-RNase herausgeschnittenen Teilsequenzen feststellen, so daß sich die Gesamtsequenz ergibt. Die Methoden zur Trennung und Identifikation der Spaltprodukte

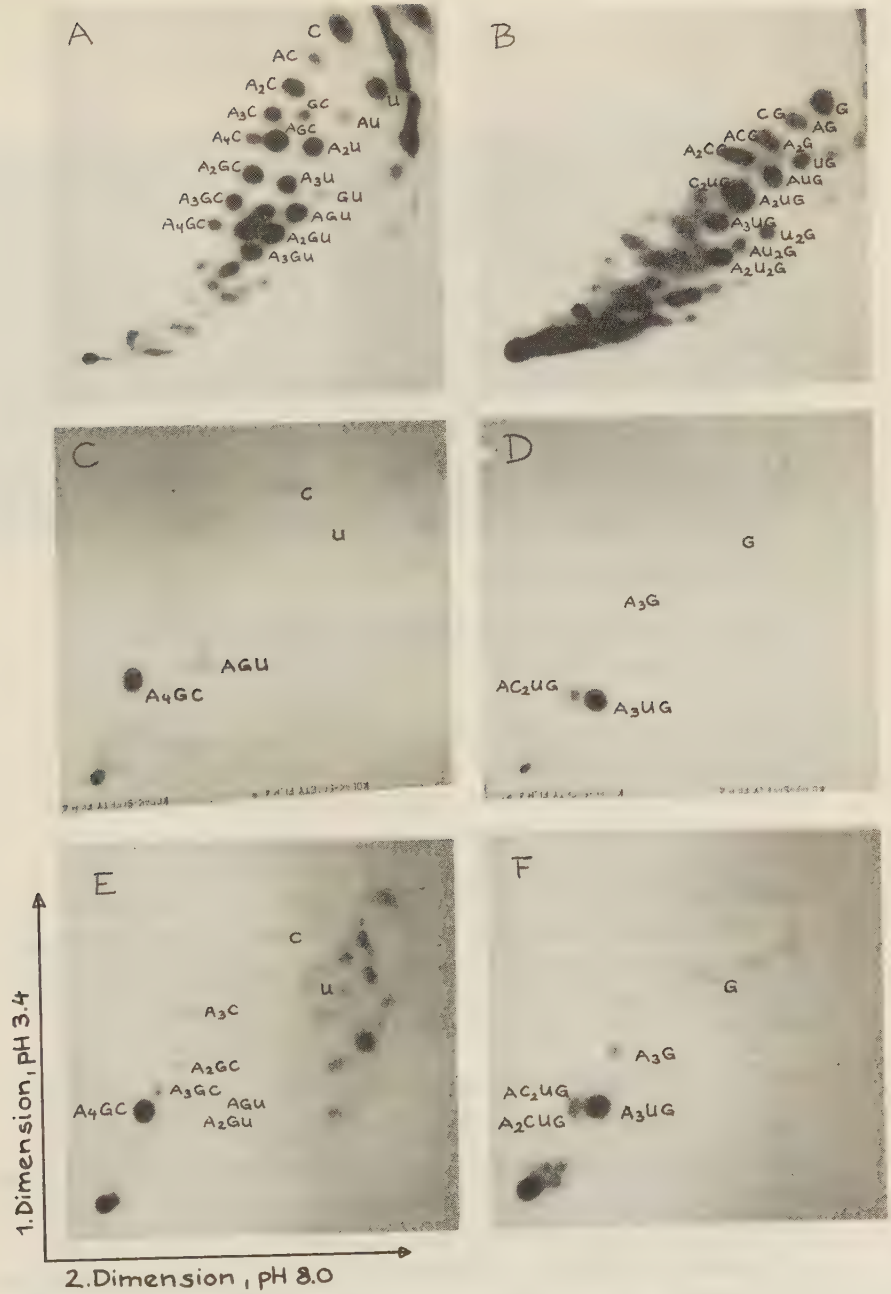


Bild 1: Oligonukleotidmuster von RNase-verdauter pRNS im Vergleich zu RF-RNS und sequenzheterogener RNS.

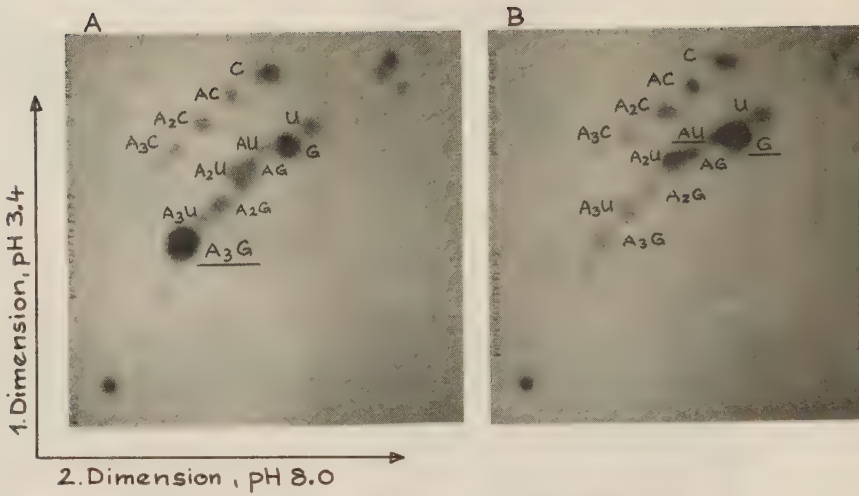


Bild 2: Analyse der Oligonukleotide durch weiteren RNase-Abbau

Nach der ersten chromatographischen Trennung auf PEI (Bild 1, C) wurden die [α^{32}P]ATP/[^{3}H]UTP markierten Pankreas-RNase-Abbauprodukte der Summenformel A_4GC (A) und AGU (B) weiter mit T_1-RNase abgebaut und gemeinsam mit einem Pankreas-RNase/T_1-RNase-Verdau von sequenzheterogener RNS chromatographiert. Die Basenzusammensetzung der sekundären RNase-Produkte (unterstrichen) ergibt sich aus der Position im Untergrundpattern der sequenzheterogenen RNS (vgl. Material und Methoden, 5.102.3).

Bild 1: Oligonukleotid-Muster von RNase-verdauter pRNS im Vergleich zu RF-RNS und sequenzheterogener RNS

Die Autoradiogramme stammen von sequenzheterogener RNS (A und B), markiert mit[α^{32}P]ATP, pRNS (C und D), markiert mit[α^{32}P] ATP, [^{3}H]UTP und RF-RNS (E und F), markiert mit [γ^{32}P] GTP, [α^{32}P]ATP, [^{3}H]UTP; pRNS und RF-RNS nach präparativer Isolierung (vgl. 5.84). Die Bilder A,C und E sind das Ergebnis von Pankreas-RNase-Abbau, die Bilder B, D und F von T_1-RNase-Abbau.

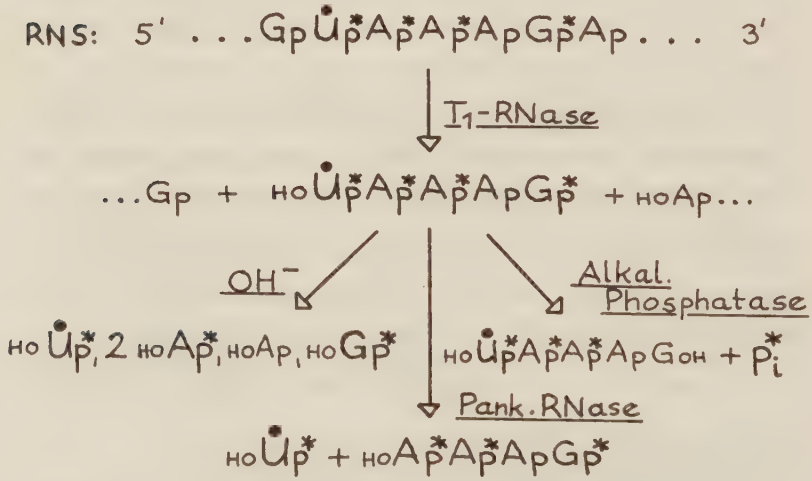
wurden im wesentlichen von F.Sanger und Mitarbeitern entwickelt. Eine Vereinfachung bedeutete die Einführung der Dünnschichtchromatographie auf Polyäthylenimin (PEI) in beiden Dimensionen zur Trennung der Oligonukleotide von Mirzabekov und Griffin (19). Bild 1, A und B, zeigt das Autoradiogramm von Pankreas-RNase- bzw. T_1-RNase-verdauter, sequenzheterogener RNS, die mit α^{32}P-ATP radioaktiv markiert wurde, nach Trennung der Oligonukleotide mittels zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie auf PEI. Die regulären Abbauprodukte mit einem Phosphorsäurerest am 3'-Ende bilden das Muster (oder Pattern) dieses Chromatogramms. Aus der relativen Lage der einzelnen Flecken läßt sich die Summenformel[3] des entsprechenden Oligonukleotids ablesen, bzw. auf wenige Alternativen eingrenzen. Die Startoligonukleotide enthalten noch das 5'-terminale Triphosphatende und verbleiben infolge ihrer hohen negativen Ladung am Auftragspunkt (links unten im Pattern) des Chromatogramms. Die 3'-terminalen Oligonukleotide sind, da sie an ihrem 3'-Ende keinen Phosphorsäurerest tragen, nur schwach geladen und wandern etwa mit der Laufmittelfront (sie wurden bei der Sequenzanalyse nicht berücksichtigt).

---

3) Als reguläre RNase-Abbauprodukte entstehen Oligomere der allgemeinen Formel $(Np)_x$, also Oligomere von 3'-Phosphorsäureestern der Nukleoside. Zur Vereinfachung der Schreibweise wird in Summenformeln oder Sequenzen solcher Mono- und Oligonukleotide nur der Nukleosidanteil (A,G,U und C, allgemein N) angegeben: z.B. das Dinukleotid AU_N, wobei N das in der Sequenz folgende Nukleosid des Nachbaroligonukleotids ist.

2.41.2 Sequenzanalyse der Oligonukleotide

Zur Sequenzanalyse der Oligonukleotide wurden diese von der Dünnschichtplatte (entsprechend ihrer Position im Pattern) eluiert. Sie waren durch das bei der Synthese verwendete radioaktive Substrat (z.B. α^{32}P-ATP und ^{3}H-UTP) markiert. Der Anteil dieser Markierung lieferte weitere Information für die Summenformel des Oligonukleotids. Der Gang der weiteren Analyse ist am Beispiel des Oligonukleotids UAAAG, das aus der RNS-Sequenz GUAAAGA durch T_1-RNase-Abbau entsteht, schematisch skizziert (Markierung der RNS mit α^{32}P-ATP(*) und ^{3}H-UTP(•)):



Die α^{32}P-Markierung nur eines bestimmten Triphosphats erlaubte die Analyse von nearest-neighbour-Beziehungen einerseits zum Nachbaroligonukleotid durch Bestimmung der ^{32}P-

Markierung im 3'-terminalen Phosphatrest des Oligonukleotids (Freisetzung des Phosphats mit alkalischer Phosphatase), andererseits innerhalb der Sequenz durch Bestimmung der ^{32}P-Markierung in den 2'(3')-Nukleosidmonophosphaten nach alkalischer Hydrolyse (Basenanalyse).

Einen wesentlichen Beitrag zur Sequenzanalyse lieferte der weitere Abbau des Oligonukleotids mit der noch nicht verwendeten RNase und die Analyse dieser Abbauprodukte. Es entstehen Produkte der Basenzusammensetzung und Sequenz A_xG, A_xU und A_xC (mit $x = 0,1,2,...$). Diese wurden auch durch zweidimensionale Dünnschichtchromatographie auf PEI getrennt (Bild 2). Durch Zusatz entsprechender Abbauprodukte aus sequenzheterogener RNS ergibt sich ein Gesamtpattern als Untergrund. Darin kann aus der Position der Abbauprodukte des Oligonukleotids deren Sequenz abgelesen werden.

Das 5'-terminale Startoligonukleotid wurde gesondert, aber mit prinzipiell den gleichen Methoden analysiert.

2.42 Präparative Isolierung der pRNS

pRNS wurde ausgehend von 10 bis 20 pmol fdRF-Molekülen synthetisiert und alternativ mit α^{32}P-ATP und ^{3}H-UTP bzw. α^{32}P-UTP und ^{3}H-GTP hoher spezifischer Aktivität radioaktiv markiert. Zur Analyse des Startoligonukleotids wurde zusätzlich γ^{32}P-GTP als Substrat angeboten, dessen Markierung im Startnukleotid der RNS erhalten bleibt.

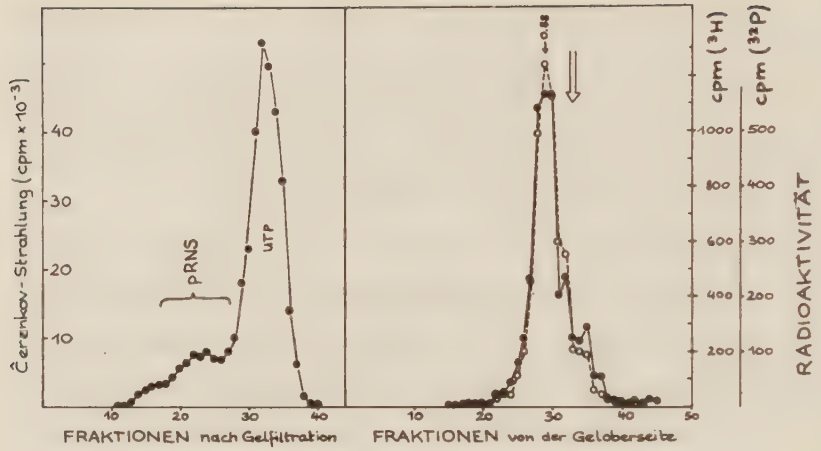


Fig.6 Fig.7

Fig. 6 : Präparative Isolierung von pRNS durch Gelfiltration auf Sephadex G 75.

pRNS wurde ausgehend von 20 pmol fdRF synthetisiert und mit [^{3}H]GTP, 15 Ci/mmol, und [α^{32}P]UTP, 3×10^9 cpm/µmol, radioaktiv markiert. Die RNS wurde nach Alkoholfällung auf die Sephadex G 75-Säule aufgetragen (vgl. 5.84). Die Radioaktivität der gesamten Fraktionen des Eluats wurde als Čerenkov-Strahlung gemessen. Die Fraktionen 18 bis 27 wurden zu pRNS vereinigt.

Fig. 7 : Analytische Gelelektrophorese der pRNS-Präparation

Eine Probe (5 %) der in Fig.6 gezeigten pRNS-Präparation wurde mittels Gelelektrophorese auf Homogenität der Kettenlänge getestet (der offene Pfeil gibt die Position des Bromphenolblau an). —O—[^{3}H]GTP-Markierung, —●—[α^{32}P]UTP-Markierung.

Nach Alkoholfällung des Syntheseprodukts wurde die pRNS durch Gelfiltration nachgereinigt (Fig.6), um die restlichen Verunreinigungen an Triphosphaten und Phosphat, sowie die kürzere RNS-Fraktion (rel. Mobilität 1.03 in der Gelelektrophorese) und eine geringere Menge etwas längerer Ketten (rel. Mobilität ca. 0.7) abzutrennen. Fig. 7 zeigt die analytische Gelelektrophorese eines so gereinigten Produkts, das als Ausgangsmaterial für die Sequenzanalyse benutzt wurde.

2.43 Teilsequenzen nach RNase-Abbau der pRNS

Bild 1, C und D, zeigt die Autoradiogramme der zweidimensionalen PEI-Chromatogramme von α^{32}P-ATP/^{3}H-UTP markierter pRNS nach Pankreas-RNase- und T_1-RNase-Abbau. Im Vergleich mit dem komplexen Muster von sequenzheterogener RNS (Bild 1, A und B) ist direkt ersichtlich, daß es sich hier um eine relativ einheitliche Sequenz handeln muß. Außer dem Fleck am Auftragspunkt zeigt das Pattern nur einen weiteren starken Fleck nach Pankreas-RNase (P-1) und zwei Hauptflecken nach T_1-RNase (T-1 und T-2). Die Verunreinigung der pRNS durch andere Sequenzen ist offenbar sehr gering, so daß der Untergrund sehr schwach und das Gesamtpattern nicht mehr zu erkennen ist. Zur Bestimmung der relativen Position der Hauptflecken mußte deshalb in einem Parallelversuch sequenzheterogene RNS zugesetzt werden, um das Pattern im Untergrund sichtbar zu machen.

(A) Markierung: $[\alpha^{32}P]$ATP, $[^{3}H]$UTP, ($[\gamma^{32}P]$GTP).

Fleck	Versuch Nr.	Summenformel, Position	relative Stärke der Radioaktivität ^{3}H	relative Stärke der Radioaktivität ^{32}P	Molverhältnis $^{32}P/^{3}H$	Sequenz	relat. molare Stärke
P-0	2	$pppG_xU$	0.9	0.9*	1.0*	$pppG_xU_A$	
P-1	1	A_4GC, A_xC	0.01	=3	250	AAAGAC_N	=1
	2		0.02	=3	150		=1
P-2	1	U	0.8	0.08	0.09	U_N	0.8
	2		4.5	0.4	0.09		4.5
P-3	1	AGU	0.32	0.32	1.0	GAU_N	0.3
	2		0.56	0.56	1.0		0.6
P-4	1	C	0.01	0.20	28	C_A	0.2
	2		0.02	0.46	24		0.5
T-0	2		0.24	1.4*	6*	pppG	
T-1	1	A_3UG	=1	=4	4.0	UAAAG_A	=1
	2		=1	=4	4.0		=1
T-2	1	CA_2UG, C_2AUG, $^{2}A_5G$	0.80	0.94	1.1	ACCUG_A	0.8
	2		0.68	0.77	1.1		0.7
T-3	1	G	0.04	0.20	5	G_A	0.2
T-4	1	A_3G	0.00	0.59	130	? (AAAG_N)	0.3

Tabelle 2.

Tabelle 2,Fortsetzung.

(B) Markierung: $[\alpha^{32}P]$UTP, $[^{3}H]$GTP.

Fleck	Versuch Nr.	Summenformel Position	relative Stärke der Radioaktivität ^{3}H	^{32}P	Molverhältnis $^{32}P/^{3}H$	Sequenz	relat. molare Stärke
P-2	3	U	0.01	0.19	17	U_U	0.2
P-3	3	AGU	0.20	0.30	1.5	(GA)U_U +(GA)$\overline{U}$_N (?)	0.2
P-4	3	C	0.00	0.70	24	C_U	0.7
T-2	3	AC_2UG	1.3	=1	0.75	ACCUG_A	=1
T-3	3	G	2.2	0.76	0.35	G_U +$\overline{G}$_N	0.8 +1.4

*:unter Berücksichtigung der $[\gamma^{32}P]$GTP-Markierung
N: eines der nicht ^{32}P-markierten Nukleotide

Tabelle 2: Quantitative Auswertung der PEI-Chromatogramme von pRNS.

Die gemessene Radioaktivität (vgl. Material und Methoden 5.101.2) in den einzelnen Positionen des Chromatogramms wurde auf die Menge der dadurch repräsentierten Nukleotide umgerechnet (Radioaktivität / spezifische Aktivität = $= \frac{\text{cpm}}{\text{cpm}/\mu\text{mol}} = \mu\text{mol}$). Das Verhältnis dieser Zahlen von ^{32}P- und ^{3}H-Markierung ist in Spalte 6 angegeben: μmol(^{32}P)/ /μmol(^{3}H). In Spalte 4 und 5 ist die in μmol umgerechnete Radioaktivität aus den einzelnen Flecken zueinander in Be-

Tabelle 2: Fortsetzung.

ziehung gesetzt worden. Als Bezugsgröße wurde die Zahl der radioaktiv markierten Nukleotide bzw. Phosphoratome eines im Pattern dominierenden Oligonukleotids gewählt (diese Zahl ergibt sich aus der Sequenz dieses Oligonukleotids): nach $[\alpha^{32}P]$ATP/$[^3H]$UTP-Markierung $A\overset{+}{A}\overset{+}{A}G\overset{+}{A}C_N$ (P-1) aus dem Pankreas-RNase-Pattern mit 3 markierten ^{32}P-Atomen ($^+$) und $U\overset{+}{A}\overset{+}{A}\overset{+}{A}G\overset{+}{_}A$ (T-1) aus dem T1-RNase-Pattern mit 4 markierten ^{32}P-Atomen bzw. 1 markierten Uridinrest; nach $[\alpha^{32}P]$UTP/$[^3H]$GTP-Markierung $ACCUG\overset{+}{_}A$ (T-2), dessen ^{32}P-Markierung (in einer Position) für Pankreas-RNase- und T_1-RNase-Pattern als Bezugsgröße dient, unter der Voraussetzung, daß beide Chromatogramme die gleiche Menge pRNS repräsentieren. Die letzte Spalte enthält die relative molare Stärke der Oligonukleotide, die sich aus der relativen Stärke der Radioaktivität (Spalte 4 und 5) und der aus der Sequenz abgeleiteten Zahl der radioaktiv markierten Positionen im Oligonukleotid ergibt. Oligonukleotide mit einer relativen molaren Stärke unter 0.2 wurden nicht in die Tabelle aufgenommen.

2.43.1 Fragmente nach Pankreas-RNase-Spaltung

Der Position des Hauptflecks (P-1) im Oligonukleotidmuster nach Pankreas-RNase, die sich im Parallelversuch mit zugesetzter sequenzheterogener RNS ergibt, entspricht die Summenformel A_4GC (alternativ A_xC). Dementsprechend enthält das Material in dieser Position von der $\alpha^{32}P$-ATP/^3H-UTP-Markierung der RNS nur die ^{32}P-Markierung.

Alkalische Phosphatase setzt kein $^{32}PO_4$ frei. Das Nachbaroligonukleotid auf der 3'-Seite beginnt also nicht mit Adenosin. Die Basenanalyse liefert ^{32}P-AMP und ^{32}P-GMP, das

aus den Teilsequenzen AA und GA stammen muß. Wegen des enthaltenen Guanosins scheidet die alternative Summenformel A_xC aus. Die Position des Guanosins innerhalb der Sequenz ergibt sich aus der Analyse der weiteren Abbauprodukte von T_1-RNase. Als einziges radioaktiv markiertes Produkt entsteht ^{32}P-A_3G. Es muß gemäß der Summenformel A_4GC daneben noch AC entstehen, das aber nicht markiert ist, weil das Nachbaroligonukleotid, wie schon aus der Analyse mit alkalischer Phosphatase hervorging, nicht mit Adenosin beginnt. Die Sequenz des Oligonukleotids A_4GC (P-1) muß also AAAGAC_N lauten, was in Übereinstimmung mit der Basenanalyse steht. Für das nachfolgende Nukleotid N aus dem Nachbaroligonukleotid scheidet außer A auch U aus ($N \neq A,U$), weil im Pankreas-RNase-Pattern von $\alpha^{32}P$-UTP-markierter RNS der Fleck P-1 nicht in Erscheinung tritt, also keine nearest-neighbour-Markierung durch Uridin erhält.

Im PEI-Chromatogramm wurden auch alle Oligonukleotide untersucht, die im Autoradiogramm nur als schwache Flecken in Erscheinung traten, um eventuell vorhandene ^3H-Markierung zu finden. Tabelle 2 gibt eine Übersicht über die quantitative Auswertung. In Spalte 4 und 5 ist eine Relativzahl für die Stärke der radioaktiven Markierung des Oligonukleotids angegeben, wobei z.B. für das Pankreas-RNase-Pattern nach $\alpha^{32}P$-ATP/^3H-UTP-Markierung die ^{32}P-Markierung in Fleck P-1 als Bezugsgröße dient. Die Bezugsgröße ist in diesem Fall gleich 3, da sich aus der Sequenz

ergibt, daß das Oligonukleotid A_4GC in drei Positionen radioaktiv markierten Phosphor enthält. Aus der relativen Stärke der radioaktiven Markierung und der Sequenz des Oligonukleotids, das heißt der Zahl der enthaltenen radioaktiv markierten Positionen, ergibt sich dessen relative molare Stärke (letzte Spalte).

Dem Fleck P-2 entspricht das Mononukleotid U. Es enthält starke ^{3}H-Markierung (^{3}H-UTP), aber nur geringe ^{32}P-Markierung (α^{32}P-ATP). Das folgende Nukleotid ist also nicht A. Die in Versuch 2 gemessene, unerwartet hohe ^{3}H-Markierung in diesem Fleck ist vermutlich auf eine Oligo-U-Sequenz am Ende der pRNS zurückzuführen, die in diesem Fall noch synthetisiert wurde.

In der ^{32}P-Markierung ist noch der Fleck P-3, seiner Position nach AGU, relativ stark. Das Verhältnis von ^{32}P- zu ^{3}H-Markierung läßt die alternativen Sequenzen AGU_A und GAU_N zu. Die Basenanalyse liefert ^{3}H-UMP und ^{32}P-GMP: A folgt also auf G und nicht auf U. Diese Entscheidung für die Sequenz GAU_N wird durch den weiteren Abbau mit T_1-RNase bestätigt: es entstehen ^{32}P-G und ^{3}H-AU(Bild 2β). Die relative molare Stärke dieses Oligonukleotids (0.3 bzw. 0.6) läßt vermuten, daß es sich am 3'-Ende der Gesamtsequenz, schon im Bereich des Kettenabbruchs befindet.

Die Teilsequenz C_A (P-4) steht entweder noch weiter rechts innerhalb der Gesamtsequenz oder ist Teil einer

Verunreinigung. Dagegen ist die Sequenz C_U (P-4) sicher in der pRNS-Sequenz enthalten; ihr entspricht der einzige Hauptfleck im Pankreas-RNase-Pattern von α^{32}P-UTP/^{3}H-GTP-markierter pRNS.

Die Spaltung der pRNS mit Pankreas-RNase liefert also folgende Teilsequenzen: AAAGAC_G (oder _C), U_N, C_U, GAU_N und (?) C_A, wobei N für G,U oder C steht.

2.43.2 Fragmente nach T_1-RNase-Spaltung

Nach α^{32}P-ATP/^{3}H-UTP-Markierung der pRNS tritt im T_1-RNase-Pattern am stärksten der Fleck T-1 in Erscheinung (vgl. Schema Seite 32). Seine Position entspricht der Summenformel A_3UG des betreffenden Oligonukleotids. Die Basenanalyse liefert ^{32}P-AMP, ^{32}P-GMP und ^{3}H/^{32}P-UMP. Alkalische Phosphatase macht $^{32}PO_4$ frei. Daraus ergibt sich vorläufig die Sequenz $(A_2U)AG_A$, wobei die Sequenz innerhalb der Klammer noch unbestimmt ist. Die Stellung des Uridin läßt sich wieder durch weiteren RNase-Abbau, jetzt mit Pankreas-RNase, bestimmen: Die Spaltprodukte sind U und A_3G. Die Sequenz ist also UAAAG_A. In Übereinstimmung damit erscheint dieser Fleck nicht im T_1-RNase-Pattern von α^{32}P-UTP-markierter pRNS, weil das Uridin am 5'-Ende des Oligonukleotids steht, und dessen Markierung bei der RNase-Spaltung auf das Nachbaroligonukleotid übertragen wird.

Die Position des Fleckes T-2 konnte nicht genau festgestellt werden, da der Austausch von A gegen C nur eine geringe Positionsänderung bewirkt, so daß zum Beispiel die Flecken CG und AG nur unvollständig getrennt werden (Bild 1,B). Außerdem läuft die Reihe A_xG in die Reihe $(C,A)_xUG$ hinein. Die alternativ möglichen Positionen sind CA_2UG, C_2AUG und A_5G. Der Fleck enthält aber ^{3}H-UTP-Markierung, bezogen auf die Zahl der dadurch repräsentierten Nukleotide, in gleicher Stärke wie α^{32}P-ATP-Markierung. Die Alternative A_5G scheidet also aus. Die Basenanalyse liefert ^{3}H-UMP und ^{32}P-GMP. Nach dem 3'-terminalen G folgt deshalb ein A, in Übereinstimmung mit dem Ergebnis der Phosphatasebehandlung, und die Position des Uridin muß vor C oder G liegen. Das ^{32}P/^{3}H-Verhältnis spricht dafür, daß außer dem terminalen Phosphat kein weiterer Phosphorsäurerest radioaktiv markiert ist. Demnach kann dieses Oligonukleotid nur einen Adenosinrest in der ersten Position enthalten, wo dieser keinen Beitrag zur ^{32}P-Markierung liefert. Dem entspricht nur die Summenformel C_2AUG mit der vorläufigen Sequenz $A(C_2U)G_A$. Die Formel CA_2UG scheidet auch deshalb aus, weil in der Basenanalyse außer ^{32}P-GMP ein weiteres ^{32}P-markiertes Nukleosidmonophosphat auftreten müßte. Pankreas-RNase liefert neben ^{32}P-G das Spaltprodukt ^{3}H-U, aber nicht ^{3}H-AU. U muß also in dritter oder vierter Position nach C folgen. Die endgültige Sequenz ergibt sich nach Pankreas-RNase-Abbau von α^{32}P-UTP-markierter pRNS: Die Markierung geht bei der RNase-Spaltung auf Mono-C (P-4) über, das nur aus der Sequenz

PyCU[4] stammen kann. Daraus folgt die vollständige Sequenz ACCUG_A.

Verunreinigungen sind wahrscheinlich die Oligonukleotide in den Flecken T-3 und T-4 (nach α^{32}P-ATP-Markierung) mit den Sequenzen G_A und AAAG. Dagegen ist der Fleck T-3 nach α^{32}P-UTP-Markierung relativ stark. Aus seiner ^{3}H-Markierung berechnet sich eine relative molare Stärke von 2.2 (bezogen auf das Oligonukleotid AC_2UG). Die ^{32}P-Markierung ist aber geringer. Demnach sollte ein Gemisch der Sequenzen G_U und G_N (N≠U) vorliegen.

Als Teilsequenzen der pRNS nach T_1-RNase-Abbau kommen also die Oligonukleotide UAAAG_A, ACCUG_A, G_G (oder _C) und G_U in Frage.

2.43.3 Anordnung der Teilsequenzen

Die Anordnung der Teilsequenzen UAAAG_A (T-1) und ACCUG_A (T-2) innerhalb der pRNS-Sequenz ergibt sich aus der folgenden Überlegung: In der Reihenfolge ACCUG_A/UAAAG_A müßte zwischen beiden mindestens ein Oligonukleotid der allgemeinen Formel ANG_U eingefügt werden. Dieses würde in Versuch 3 (vgl. Tabelle 2) die ^{32}P-Markierung des benachbarten U erhalten. Es findet sich dort nur markiertes G, das aus der Sequenz G_G_U stammen muß. Es wäre also die Sequenz ACCUG_ANG_G_UAAAG_A denkbar, wobei ANG weder in Versuch 1 und 2, noch in Versuch 3 als ^{32}P-markiertes Produkt in Erscheinung

4) Py steht für ein Pyrimidinderivat, also U oder C

treten darf. Dieses "unsichtbare" Oligonukleotid müßte dann die Formeln AG oder ACG besitzen. Im Pankreas-RNase-Pattern wäre dann das Auftreten der Oligonukleotide GAC und GGU bzw. GAGGU zu fordern. Diese Spaltprodukte sind dort aber nicht zu finden.

Dagegen wird die Reihenfolge UAAAG_A/ACCUG_A durch den Befund bestätigt, daß die Patterns der von der pRNS abgetrennten sehr kurzen RNS den Fleck T-2 nicht mehr enthalten. Ein zwischen UAAAG und ACCUG liegendes Oligonukleotid müßte die Sequenz ANG_A besitzen, wird aber nicht gefunden. Demnach sind beide direkt benachbart und fügen sich zu der Sequenz ...G_UAAAG_ACCUG_A... zusammen. Dies wird bestätigt durch das mit Pankreas-RNase entstehende,in der Sequenz überlappende Oligonukleotid AAAGAC (P-1). Die übrigen nach Pankreas-RNase auftretenden Sequenzen C_U, U_N und GAU_N lassen sich zwanglos anfügen. Es ergibt sich damit für die pRNS die Sequenz ...GUAAAGACCUGAU..., wobei die Anordnung der Teilsequenzen G_U und G_N (T-3) noch nicht geklärt ist.

2.44 Das Startoligonukleotid

Das 5'-terminale Startoligonukleotid verbleibt bei der zweidimensionalen PEI-Chromatographie am Auftragspunkt. Um die Homogenität dieses Materials zu prüfen, mußte ein Laufmittel gefunden werden, worin dieses 5'-terminale Oligonukleotid beweglich wird. Um die Methode zu entwickeln, bot

sich die sogenannte (-CTP)RNS an (vgl. 2.31), da hier eine sehr kurze Startsequenz in hohen Ausbeuten erhalten wird. Die Sequenzanalyse dieser RNS soll deshalb an dieser Stelle beschrieben werden.

2.44.1 Das Startoligonukleotid von (-CTP)RNS

Bei zweidimensionaler Chromatographie in einem Laufmittelsystem hoher Ionenstärke und (1. Dimension) hoher Acidität läßt sich das Startoligonukleotid vom Auftragspunkt fortbewegen. Nach γ^{32}P-GTP/^{3}H-UTP-Markierung der (-CTP)RNS und Pankreas-RNase- bzw. T_1-RNase-Abbau findet sich im Pattern jeweils ein Hauptfleck. Diesem muß nach T_1-RNase das Guanosintetraphosphat pppGp entsprechen, da T_1-RNase sofort nach dem ersten Guanosinrest schneidet. Der entsprechende Fleck nach Pankreas-RNase enthält neben der γ^{32}P-Markierung auch ^{3}H-Markierung im molaren Verhältnis 1 : 1. Die Sequenz ist demnach $pppGN_xU$ (N = A oder G) oder pppGU. Nach α^{32}P-ATP/^{3}H-UTP-Markierung enthält dieser Fleck wieder beide Markierungen, während das Guanosintetraphosphat keine Markierung enthält und im Autoradiogramm nicht in Erscheinung tritt. In zweiter Position nach G folgt also kein A. Auch Sequenzen der Art pppGGAU sind ausgeschlossen, da die Basenanalyse (nach alkalischer Hydrolyse) nicht ^{32}P-GMP sondern ^{3}H/^{32}P-UMP liefert. Das Pankreas-RNase-Startoligonukleotid wird also durch das ihm in der Sequenz nachfolgende A markiert, und seine Sequenz kann demnach auf die Alternativen pppGU_A oder $pppGG_xU$_A (x = 1, 2, 3,...) eingegrenzt werden.

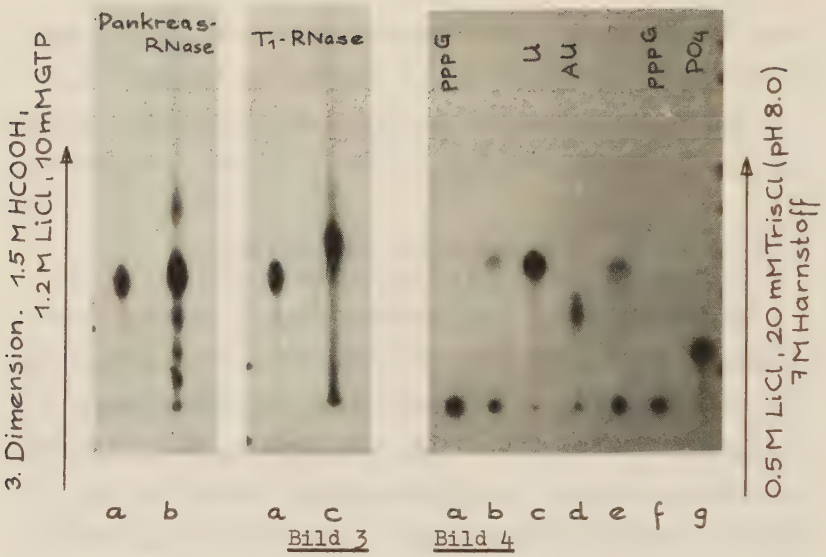


Bild 3: Chromatographie der 5'-terminalen Startoligonukleotide von pRNS.

Das Material, das nach der zweidimensionalen Chromatographie der pRNS-Abbauprodukte (markiert mit $[\gamma^{32}P]$GTP, $[\alpha^{32}P]$ATP und $[^{3}H]$UTP) am Auftragspunkt verblieb, wurde in einem dritten Lauf chromatographisch getrennt (vgl. 5.101.3), parallel mit einem nachträglich aufgetragenen Pankreas-RNase-Verdau von (-CTP)RNS. Das Startoligonukleotid der (-CTP)RNS dient als Marker (a) für die Mobilität des Startnukleotids von pRNS nach Pankreas-RNase- (b) und T_1-RNase- (c) Abbau.

Bild 4: Analyse des Pankreas-RNase-Startoligonukleotids.

Nach Chromatographie in der 3.Dimension (vgl. Bild 3,b,Hauptfleck) wurde das aus dem Pankreas-RNase-Abbau stammende Startoligonukleotid weiter mit T_1-RNase abgebaut. Diese sekundären Abbauprodukte aus pRNS (b) und RF-RNS (e) wurden parallel mit den entsprechenden primären T_1-RNase-Abbauprodukten (nach Chromatographie in der 3.Dimension; a und f), mit $^{32}PO_4$ (g), sowie den Pankreas-RNase-Spaltprodukten AU (d) und U (c) chromatographiert (vgl. 5.102.3).

Die anfangs benutzte zweidimensionale Dünnschichtchromatographie zur Trennung der Startoligonukleotide konnte nur mit bestimmten Chargen von PEI-Platten reproduziert werden. Auf anderen Platten konnte das störende starke Schmieren durch Verringerung der Molarität des Laufmittels und besonders durch den Zusatz von 10 mM GTP verhindert werden. Bild 3 zeigt die eindimensionale Chromatographie von Pankreas-RNase-verdauter (-CTP)RNS, die dort als Marker verwendet wurde, mit 1.5 M HCOOH, 1.2 M LiCl, 10 mM GTP als Laufmittel. Es wird so eine relativ gute Auflösung erreicht, so daß auch die drei schwachen Nebenflecken unterhalb des Hauptfleckes deutlich hervortreten.

2.44.2 Das Startoligonukleotid von pRNS

Zur Analyse der Startsequenz von pRNS wurde diese zusätzlich zur α^{32}P-ATP/^{3}H-UTP-Markierung mit γ^{32}P-GTP am 5'-Ende markiert. Das Material, das nach der zweidimensionalen Chromatographie der RNase-Abbauprodukte am Auftragspunkt zurückblieb, wurde in einem dritten Lauf noch einmal in Richtung der 1.Dimension mit dem oben angegebenen GTP-haltigen Laufmittel chromatographiert (3.Dimension, Bild 3).

Bezüglich der Wanderungsgeschwindigkeit und der Art des Aufspaltens verhält sich der Startfleck aus dem Pankreas-RNase-Pattern so wie die durch RNase-Verdau von (-CTP)RNS gewonnene Vergleichssubstanz. Alle Flecken enthalten ^{32}P-

und ^{3}H-Markierung, die entsprechenden Startoligonukleotide müssen also mit U enden. Nur der Hauptfleck wurde weiter analysiert. Die Stärke seiner ^{32}P-Markierung entspricht einer Markierung durch $\gamma^{32}P$-GTP und $\alpha^{32}P$-ATP. Mögliche Sequenzen wären dann $pppG_xU_A$ oder $pppG_xAU_N$ ($x = 1, 2, 3, \ldots$; $N \neq A$). Bild 4 zeigt das Ergebnis der Chromatographie nach weiterem T_1-RNase-Abbau im Vergleich zu den Pankreas-RNase-Abbauprodukten U und AU. Neben Guanosintetraphosphat entsteht $^{3}H/^{32}P$-markiertes Uridinmonophosphat. In der Sequenz muß also A nach U folgen. Das Pankreas-RNase-Startoligonukleotid von pRNS ist demnach identisch mit der Vergleichssubstanz $pppG_xU_A$, wobei die Zahl der Guanosinreste am Anfang der Sequenz unsicher ist.

Der Startfleck aus dem T_1-RNase-Pattern wandert im Nachlauf (3.Dimension, Bild 3,C) als einheitliches Material (abgesehen von einem Schmier) mit einer relativen Laufstrecke von 1.2 bezogen auf den Marker $pppG_xU$. Dieses Material, erwartungsgemäß Guanosintetraphosphat, enthält (bis auf eine geringe Verunreinigung, die bei Rechromatographie verschwindet) dementsprechend auch keine ^{3}H-Markierung.

2.45 Gesamtsequenz der pRNS

An die Sequenz des Startoligonukleotids (nach Pankreas-RNase) schließt sich die übrige Sequenz, beginnend mit dem Oligonukleotid aus Fleck P-1 unmittelbar an: $pppG_xU_AAAGAC...$ Ein weiteres, dazwischenliegendes Oligonukleotid der Sequenz ANU wäre zwar denkbar, wird aber im Pankreas-RNase-Pattern nach α^{32}P-ATP-Markierung nicht gefunden. Dagegen sind im T_1-RNase-Pattern nach α^{32}P-UTP/^{3}H-GTP-Markierung die Sequenzen G_N und G_U (T-3) nachgewiesen, aber bisher nicht eingeordnet worden. Dabei kann die ^{32}P-Markierung in Fleck T-3 nur dem 5'-terminalen U des Oligonukleotids UAAAG (T-1) entstammen, welches bei dieser Markierung selbst nicht in Erscheinung tritt. Es sind also daraus Startsequenzen der Art pppG_G_UAA... und (unter Berücksichtigung der Teilsequenz G_N ($N \neq U,A$) pppG_G_G_UAA... abzuleiten.

Wahrscheinlich sind in der Startsequenz der allgemeinen Formel $pppG_xU_A$ verschiedene Werte von x verwirklicht, entsprechend der in Bild 3,b in Erscheinung tretenden Heterogenität des Pankreas-RNase-Startnukleotids. Diese Heterogenität läßt sich nur schwer als Verunreinigung mit anderen RNS-Sequenzen erklären, da sonst im Pankreas-RNase-Pattern Verunreinigungen dieser Stärke nicht zu finden sind. Deshalb erscheint es sinnvoll, diese Heterogenität auf geringe Verschiebungen des Startpunktes innerhalb der Sequenz zurückzuführen.

Der erwähnte Befund (12), daß der RNSpolymerase-fdRF-Komplex bei Zugabe von GTP als einzigem Ribonukleosidtriphosphat eine Oligo-G-Kette synthetisiert, unterstützt diese Interpretation der Ergebnisse, daß nämlich eine in der Länge variable Oligo-G-Sequenz zu Beginn der pRNS-Sequenz synthetisiert wird.

Die Gesamtsequenz der pRNS kann nun folgendermaßen angegeben werden:

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

$pppG_x$ U A A A G A C C U G A U u u . . mit x = 1, 2, 3,...

wobei die verschiedenen Werte von x einerseits eine Unsicherheit in der Zahl der Guanosinreste am Beginn der als Hauptprodukt vorliegenden Sequenz, andererseits wahrscheinlich eine tatsächlich vorliegende Heterogenität angeben.

2.5 Startsequenz von fdRF-transkribierter RNS (Sequenzvergleich mit pRNS)

Es soll in diesem Kapitel gezeigt werden, daß der Startpunkt der (in vitro) Transkription von fdRF innerhalb der Bindungsstelle der RNSpolymerase liegt - durch den Nachweis der Identität der pRNS-Sequenz mit der Startsequenz von fdRF-transkribierter RNS. Auf Grund statistischer Überlegungen wird gefolgert, daß beide RNS-Sorten am gleichen Startpunkt innerhalb des fdRF-Templates initiiert werden.

2.51 Aussagekraft des Sequenzvergleichs

Die eindeutige Zuordnung einer bestimmten RNS-Sequenz zu einem bestimmten Ort der Template-DNS gelingt mit zwei im Prinzip gleichartigen Methoden: der vergleichenden Sequenzanalyse und der Hybridisierung. Die Sicherheit dieser Zuordnung ist allerdings von der Länge der betrachteten RNS-Sequenz und der Gesamtlänge der DNS abhängig. Denn die Zahl der möglichen Teilsequenzen wächst mit der Gesamtlänge der DNS, und je kürzer der Ausschnitt aus der Gesamtsequenz ist, umso größer ist die Wahrscheinlichkeit, daß dieser Sequenzausschnitt an einer anderen Stelle noch einmal vorkommt. Unter der Annahme statistischer Basenverteilung ist die Häufigkeit (H) einer bestimmten Sequenz von n Nukleotiden Länge innerhalb einer Gesamtsequenz von N Nukleotiden $H = N/4^n$. Mit der Bedingung, daß die Sequenz der Länge n im Mittel seltener als einmal in der Gesamtsequenz vorkommt, gilt für die DNS des Phagen fd mit ca. 6 000 Nukleotiden:

$$H = 6000/4^n < 1$$

$$4^n > 6000$$

$$n \geq 7$$

Eine Sequenz muß also mindestens die Länge von 7 Nukleotiden haben, um sie einer bestimmten Stelle aus der Gesamtsequenz von 6000 Nukleotiden zuordnen zu können.

Es soll in diesem Fall die pRNS-Sequenz der Startsequenz der fdRF-transkribierten RNS (RF-RNS), und damit der normalen Initiationsstelle auf fdRF zugeordnet werden, um auszu-

schließen, daß die pRNS von irgendeiner Stelle des Genoms stammt, an der normalerweise keine Initiation stattfindet. Grundsätzlich kann nur die Wahrscheinlichkeit angegeben werden, mit der diese Zuordnung erlaubt ist. Wenn die Identität der pRNS-Sequenz mit der RF-RNS-Startsequenz festgestellt worden ist, muß ausgeschlossen werden, daß dieselbe Sequenz an einer zweiten Stelle des fdRF noch einmal vorkommt; das ist aber nur mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit möglich. Die Wahrscheinlichkeit P für eine Sequenz, die im Mittel H-mal vorkommt, nicht (bzw. bei einer bereits nachgewiesenen Sequenz nicht noch einmal) verwirklicht zu sein, ist auf Grund der Poisson-Verteilung:

$$P_o = e^{-H} .$$

Soll die Aussage über die eindeutige Zuordnung der Sequenz bis auf 1% gesichert sein, so gilt:

$$P_o = e^{-H} = 0.99$$

und wenn das gesamte Template als Ort für den Transkriptionsstart in Betracht gezogen wird (mit der Einschränkung, daß nur der Minusstrang des fdRF als Template dient), ist mit $H = 6000/4^n$

$$P_o = e^{-6000/4^n} = 0.99$$

$$-6000/4^n = \ln 0.99$$

$$4^n \approx 6 \times 10^5$$

$$n = 9.6$$

Es wäre also zu fordern, die Identität der Startsequenz von RF-RNS mit der Sequenz von pRNS auf 10 Nukleotide nachzuweisen, um die Aussage mit weniger als 1% Fehlerwahrscheinlichkeit abzusichern (oder 9 Nukleotide für weniger als 5%).

In diese Berechnungen gehen allerdings keine Annahmen über die räumliche Beziehung von Bindungs- und Startstelle ein. Sobald Annahmen über die mögliche Entfernung des Startpunktes der RF-RNS zur Bindungsstelle der RNSpolymerase eingegeben werden, ist die Übereinstimmung einer entsprechend kürzeren RNS-Sequenz mit der pDNS-Sequenz für ihre Zuordnung zur pDNS als Ort der Transkription ausreichend.

Alle diese Überlegungen beruhen auf der Annahme statistischer Basenverteilung. Nun ist aber nicht auszuschließen, daß eine Sequenz im Promoterbereich, die nach statistischen Berechnungen sehr selten vorkommen sollte, dennoch zwei- oder mehrmals im Genom vorkommt, gerade weil sie nicht der Proteincodierung dient, sondern eine bestimmte Funktion für die Protein-Nukleinsäure-Wechselwirkung erfüllt. Die bisherigen Ergebnisse sprechen allerdings dagegen: die bisher analysierten RNS-Startsequenzen verschiedener in vitro Systeme zeigen keine deutlichen Sequenzanalogien.

2.52 Startsequenz von fdRF-transkribierter RNS (RF-RNS)

2.52.1 Isolierung kurzer RNS-Ketten

Es sollten zum Sequenzvergleich mit pRNS von der fdRF-transkribierten RNS (RF-RNS) Ketten zur Verfügung stehen, die gerade die Länge der pRNS haben, also Ketten von etwa 10 bis 15 Nukleotiden Länge. Da die Initiation der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist, ist eine Synchronisation

der RNS-Synthese nicht möglich. Unter den gewählten Bedingungen von 50 µM Ribonukleosidtriphosphat sind erst nach etwa 10 min alle RNS-Ketten gestartet. Aber schon nach 30 sec ist mittels der Gelelektrophorese ein Spektrum von RNS-Ketten aller Längen bis zu etwa 300 Nukleotiden nachzuweisen.

Um Ketten der gewünschten Länge zu erhalten, wurde wie zur Isolierung der pRNS das Gemisch der RNS-Ketten über Sephadex G 75 fraktioniert, wobei die Ketten der pRNS-Länge kurz nach dem Ausschlußvolumen eluieren. Die Fraktion der Länge 10 bis 15 Nukleotide macht weniger als 1 % der Gesamtmasse aus, so daß auch nach Rechromatographie noch lange Ketten als Verunreinigung in der isolierten kurzen RF-RNS enthalten waren.

2.52.2 Sequenzanalyse

Die Analyse der Startsequenz von RF-RNS wurde nur mit α^{32}P-ATP/^{3}H-UTP-, teilweise zusätzlich γ^{32}P-GTP-markierter RNS durchgeführt. Nach Abbau mit Pankreas- bzw. T_1-RNase wurden die entstehenden Oligonukleotide in gleicher Weise wie zur Analyse der pRNS durch zweidimensionale Dünnschichtchromatographie auf PEI getrennt. Tabelle 3 gibt die quantitative Auswertung der erhaltenen Chromatogramme wieder. Dabei entspricht Versuch 2 den in Bild 1, E und F gezeigten Autoradiogrammen. Das Material von Versuch 2 hat etwa pRNS-Länge (rel.Mobilität 0.8 bis 1.0)

mit einer Verunreinigung von etwa 50 % (Massenanteil) an längeren Ketten. Das Material von Versuch 1a enthält nur RNS-Ketten, die größer sind als pRNS, mit einer relativen Mobilität von 0.9 als unterer Grenze (ca. 1/3 im Bereich rel. Mobilität von 0.8 bis 0.9). Das Material von Versuch 1b ist kleiner (rel. Mobilität 0.9 bis 1.1) als pRNS.

Das Pattern der Startsequenz (Bild 1, E und F) ist dem von pRNS sehr ähnlich. Als Hauptflecken erscheinen wieder P-1 und T-1, entsprechend den Oligonukleotiden A_4GC und UA_3G. Allerdings ist der Untergrund stärker, hauptsächlich auf Grund der Verunreinigung mit langkettiger RNS

Die Sequenzanalyse wurde analog der Analyse von pRNS durchgeführt. Das Material, das bei der zweidimensionalen Chromatographie am Auftragspunkt bleibt, wird im Nachlauf (3.Dimension, vgl. Bild 3) in gleicher Weise in einen Hauptfleck und drei Nebenflecken höherer Kettenlängen aufgespalten, wie dasjenige von pRNS und (-CTP)RNS. Nach weiterem T_1-RNase-Abbau wird wie dort $^{32}P/^{3}H$-markiertes Uridinmonophosphat abgespalten (Bild 4), allerdings tritt noch ein Nebenprodukt (30 % der ^{32}P-Markierung) auf, das keine ^{3}H-Markierung enthält. Es muß der Position nach ein Nukleosidmonophosphat sein, CMP oder GMP.

Die Sequenzanalyse der Oligonukleotide A_4GC und A_3UG führte zu dem gleichen Ergebnis wie bei pRNS: AAAGAC_N (P-1) und UAAAG_A (T-1). In den Fraktionen mit sehr kurzen RNS-Ketten (Versuch 1b) dominieren im Pattern neben

dem Startfleck diese Oligonukleotide. Zwar sind in Versuch 1b auch die Mononukleotide U und C noch relativ stark, aber ihre Bedeutung in Bezug auf die Sequenz ist schwer abzuschätzen, da die Wahrscheinlichkeit ihres Vorkommens auch in jeder Verunreinigung hoch ist. Aus der Analyse des Startoligonukleotids und der RNS-Fraktion mit niedrigster Kettenlänge (Versuch 1b) ergibt sich damit wieder die von der pRNS her bekannte Sequenz $pppG_xUAAAGAC...$

Die im folgenden von der pRNS-Sequenz her zu erwartenden Oligonukleotide sind C_2AUG (T-2) und AUG (P-3). Der Fleck T-2 ist im Pattern von Versuch 2 schon schwach vorhanden, seine relative Stärke steigt dann mit wachsender mittlerer Kettenlänge. Seine Sequenz kann auf Grund von weiterem Pankreas-RNase-Abbau und von Basenanalyse nur in der Form AC(CU)G_A angegeben werden, wobei die Position von U nicht bestimmt ist, da hier keine α^{32}P-UTP-markierte RNS zur Analyse verwendet wurde. Der Fleck P-3 tritt erst in Versuch 1a auf. Die Sequenz des entsprechenden Oligonukleotids ergibt sich aus dem $^{32}P/^{3}H$-Verhältnis und dem Auftreten von ^{32}P-markiertem GMP in der Basenanalyse wieder zu GAU_N.

Die Reihenfolge festzustellen,mit der bestimmte Flecken entsprechend höherer Kettenlänge auftreten, ist durch die Verunreinigung mit sehr langen RNS-Ketten erschwert. In Versuch 1a tritt im T_1-RNase-Pattern schon eine Serie relativ großer Oligonukleotide auf, deren Basenzusammensetzung nur aus der Position und dem $^{32}P/^{3}H$-Verhältnis ge-

schätzt wurde. Die daraus abgeleitete relative molare Stärke ist maximal 0.4 (T-9).

Neben der Verunreinigung mit längeren Ketten scheint noch eine zweite Sequenz als Nebenprodukt in der RNS-Präparation vorhanden zu sein. Denn in Position CA_2UG (?) tritt ein Fleck (T-5) auf, der auch im Pattern von RNS aus Fraktionen mit sehr geringer Kettenlänge noch vorhanden ist, wo die anderen Verunreinigungen schon abgetrennt sind. Seine ^{32}P-Markierung übertrifft dort sogar die von C_2AUG (T-2). Die relative molare Stärke (errechnet aus der ^{3}H-Markierung) steigt aber nur auf 0.3 bei höherer Kettenlänge (Versuch 1a). Es ist deshalb unwahrscheinlich, daß dieses Oligonukleotid ein Teil der als Hauptprodukt vorliegenden Sequenz ist.

Obwohl der Untergrund in den Patterns der Chromatogramme aus den besprochenen Gründen relativ hoch ist, ragen doch folgende Oligonukleotide darüber hinaus: nach Pankreas-RNase-Abbau sind das $pppG_xU_A$ (P-0), AAAGAC_N (P-1), U_N (P-2), GAU_N (P-3) und C_A (P-4); nach T_1-RNase-Abbau pppG (T-0), UAAAG_A (T-1) und AC(CU)G_A (T-2). Die bereits oben festgelegte Sequenz $pppG_xUAAAGAC$ wird bei höherer Kettenlänge um das T_1-RNase-Oligonukleotid AC(CU)G_A erweitert, das sich wegen des 5'-terminalen Adenosinrestes notwendig an das Oligonukleotid UAAAG_A anschließt. Das Pankreas-RNase-Abbauprodukt C_A (P-4) fügt sich allerdings nicht in diese Sequenz ein, auch die Stärke des Flecks P-2 (U_N) übersteigt den er-

warteten Wert. Beide Flecken treten aber im Chromatogramm von RNS aus Fraktionen noch höherer Kettenlänge noch sehr viel stärker hervor, sie sind deshalb als Verunreinigungen durch die langkettige RNS anzusehen. Aus dem gleichen Grund kann auch die Teilsequenz GAU_N nicht mit Sicherheit der RF-RNS-Startsequenz zugeordnet werden, obwohl sie sich zwanglos einfügt. Es ergibt sich nun die Gesamtsequenz

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

$pppG_x$ U A A A G A C (C U) G A u . . . aus den Teilsequenzqn der T_1-RNase-Spaltung, die von den Teilsequenzen der Pankreas-RNase-Spaltung bis Position 8 bestätigt wird.

2.53 Identität des Startpunktes von RF-RNS und von pRNS

Die oben angegebene Startsequenz der fdRF-transkribierten RNS ist,soweit analysiert, identisch mit der Sequenz von pRNS. Die mittlere Häufigkeit einer bestimmten Sequenz der Länge von 12 Nukleotiden (unter Einrechnung der Unsicherheit in Position 9 und 10) innerhalb der Gesamtsequenz der Template-DNS von ca. 6000 Nukleotiden ist

$$H = 6000/4^{10} \times 2/4^{2}$$

$$H = 0.75 \times 10^{-3}$$

Die Wahrscheinlichkeit, daß diese Sequenz nicht ein zweites Mal innerhalb der Gesamtsequenz der Template-DNS vorkommt, ist

$$P_o = e^{-H} = e^{-0.75 \times 10^{-3}} = 0.9992$$

Unter Annahme einer statistischen Basenverteilung läßt sich

aus der Identität der analysierten Sequenzen von pRNS und RF-RNS folgern, daß sie beide vom gleichen Syntheseort innerhalb der Nukleotidsequenz des fdRF stammen, wobei diese Aussage mit 0.1 % Fehlerwahrscheinlichkeit gesichert ist.

Das bedeutet: der Start der Transkription liegt innerhalb der RNSpolymerase-Bindungsstelle, und die am isolierten RNSpolymerase-pDNS-Komplex synthetisierte pRNS wird am gleichen Initiationspunkt gestartet wie die in vitro Transkription von fdRF und ist somit ein echtes Transkriptionsprodukt der pDNS.

Tabelle 3: Quantitative Auswertung der PEI-Chromatogramme von RF-RNS.

Die RF-RNS war mit $[\alpha^{32}P]$ATP und $[^{3}H]$UTP (in Versuch 2 zusätzlich mit $[\gamma^{32}P]$GTP) radioaktiv markiert. Die Auswertung der Pankreas-RNase- und T_1-RNase-Chromatogramme wurde durchgeführt wie unter Tabelle 2 beschrieben.

Fleck	Versuch Nr.	Summenformel, Position	relative Stärke der Radioaktivität ^3H	relative Stärke der Radioaktivität ^{32}P	Molverhältnis $^{32}P/^3H$	Sequenz	relat. molare Stärke
P-0	2	$pppG_xU$			1.2*	$pppG_xU_A$	
P-1	1b	A_4GC	0.00	=3		AAAGAC	=1
	2		0.00	=3			=1
	1a		0.01	=3	500		=1
P-2	1b	U	1.2	0.09	0.08	U_N	1.2
	2		0.13	0.05	0.4		0.1
	1a		2.2	0.34	0.16		2.2
P-3	1b	AGU	0.03	0.06		GAU_N	0.0
	2		0.05	0.05	1		0.05
	1a		0.84	0.88	1.0		0.9
P-4	1b	C	0.00	0.45	66	C_A	0.5
	2		0.00	0.13	60		0.1
	1a		0.02	1.08	46		1.1
P-5	1a	GU	0.23	0.06	0.24	GU_N	0.2
P-6	1a	AGC	0.00	0.25	76	? (GAC_N)	0.25
P-7	1a	A_2C	0.01	0.20	16	? (AAC_N)	0.2
P-8	1a	AU	0.24	0.05	0.2	AU_N	0.2

Tabelle 3.

Tabelle 3, Fortsetzung.

Fleck	Versuch Nr.	Summenformel Position	relative Stärke der Radioaktivität ^3H	^{32}P	Molverhältnis $^{32}P/^3H$	Sequenz	relat. molare Stärke
T-0	2				5	pppG	
T-1	1b 2 1a	UA_3G	0.99 0.8 1.09	=4 =4 =4	4.0 5.2 3.6	UAAAG_A	=1 =1 =1
T-2	1b 2 1a	C_2AUG	0.14 0.32 0.68	0.21 0.61 0.73	1.5 1.9 1.1	AC(CU)G_A	0.1 0.3 0.7
T-4	2 1a	A_3G	0.00 0.02	0.55 0.06	440 2.6	? (AAAG_N)	0.3 0.03
T-5	1b 2 1a	CA_2UG	0.14 0.0 0.30	0.52 0.51 0.78	3.7 2.6	?	0.14 ? 0.3
T-7	1a 2	? $(..U_3G)$	0.85 0.58	0.84 0.52	0.97 0.90	? $(.A_3U_3G)$	0.3 0.2
T-8	1a	? $(..U_4G)$	1.25	0.26	0.21	? $(.AU_4G)$	0.3
T-9	1a	? $(..U_5G)$	2.4	0.42	0.17	? $(.AU_5G)$	0.4
T-10	1a 2	?	0.73 0.49	0.70 0.57	0.96 1.2	? $(.A_3U_3G)$	0.2 0.2
T-12	1a	? $(..U_6G)$	2.1	0.62	0.3	? $(.A_2U_6G)$	0.3

3 ZUSAMMENFASSUNG

Am Beispiel der in vitro Transkription des Bakteriophagen fd wurde die Funktion der stabilen und spezifischen Bindung der RNSpolymerase an das DNS-Template in ihrem Zusammenhang mit der Initiation der RNS-Synthese untersucht. Im in vitro Versuch transkribiert E.coli-RNSpolymerase die enzymatisch synthetisierte fdRF-DNS strangselektiv in gleicher Weise wie in vivo. Unter Bedingungen, unter denen bei niedrigem RNSpolymerase/fdRF-Verhältnis bevorzugt nur eine Bindungsstelle besetzt wird, wird die RNS-Synthese entsprechend nur an einer Startstelle initiiert.

Aus dem Bindungskomplex von Rnspolymerase und fdRF entsteht durch DNase-Abbau der ungeschützten fdRF-DNS der isolierte Komplex aus RNSpolymerase und ihrer Bindungsstelle (pDNS). Bei Zugabe der Ribonukleosidtriphosphate zu diesem Komplex kann RNS-Synthese an dem verbleibenden pDNS-Template nachgewiesen werden: Diese sogenannte pRNS hat eine Länge von etwa 13 Nukleotiden. Sie wird komplementär zum Minusstrang der pDNS synthetisiert, besitzt also die gleiche Strangspezifität wie von fdRF-DNS transkribierte RNS.

Sowohl die Nukleotidsequenz von pRNS als auch die Startsequenz (bis Position 12) von fdRF-transkribierter RNS wurden analysiert. Die pRNS-Sequenz lautet $pppG_xUAAAGACCUGAU$; die Startsequenz der fdRF-transkribierten RNS ist mit dieser

identisch. Daraus ergibt sich, daß beide vom gleichen Ort des Templates transkribiert, und vom gleichen Initiationspunkt gestartet werden. Die Folgerung ist, daß der Initiationspunkt der Transkription innerhalb der RNSpolymerase-Bindungsstelle liegt, und daß die für die Spezifität der Initiation notwendige DNS-Sequenz in der Bindungsstelle enthalten ist, da der isolierte RNSpolymerase-pDNS-Komplex in seiner Fähigkeit, die Transkription zu initiieren, autonom ist.

4 DISKUSSION

Die spezifische Bindung der RNSpolymerase an doppelsträngige DNS ist durch die Kältesensitivität der Komplexe und die Beteiligung der σ-Untereinheit der RNSpolymerase in diesem Komplex charakterisiert, wie es von Hinkle und Chamberlin (3,4) für T_7-DNS und Nüßlein (12) für fdRF-DNS gezeigt wurde. Auf Grund dieser Spezifitäten, die analog für die Initiation der RNS-Synthese gelten, wurde gefolgert, daß die RNSpolymerase-Bindungsstellen Bestandteile des Promoters mit in vivo Funktion darstellen. Die Gültigkeit dieser Annahme wurde hier auf direktem Wege nachgewiesen: Unter Erhaltung der im Bindungskomplex vorgegebenen Spezifität beginnt die RNSpolymerase bei Zugabe der Ribonukleosidtriphosphate direkt, ohne das Template zu verlassen, die DNS strangspezifisch zu transkribieren.

Die eigentliche Fragestellung dieser Arbeit betrifft die Funktion der Bindungsstelle innerhalb des Gesamtvorganges der Initiation der Transkription; auf der Ebene der DNS ist das die Frage nach der Topologie der Promoterregion, nach der räumlichen Zuordnung von Bindungsstelle und Initiationsstelle.

In vorausgegangenen Arbeiten (11,12) wurde gezeigt, daß unter bestimmten Bedingungen bevorzugt eine Bindungsstelle in fdRF-DNS von der RNSpolymerase besetzt wird, und daß diese Bindungsstelle als DNase-resistentes Fragment (pDNS) iso-

liert und charakterisiert werden kann. So war jetzt die Möglichkeit gegeben, die Zuordnung dieser bestimmten Bindungsstelle zur Initiation der RNS-Synthese zu untersuchen: Nach Bildung des stabilen RNSpolymerase-fdRF-Komplexes und DNase-Abbau der ungeschützten fdRF-DNS in der Umgebung der Bindungsstelle bleibt der RNSpolymerase-pDNS-Komplex zurück. Dieser ist autonom in seiner Fähigkeit zur spezifischen Initiation der Transkription bei Zugabe der Ribonukleosidtriphosphate. Das impliziert: der Initiationspunkt der Transkription liegt innerhalb der Bindungsstelle. Es wird damit gezeigt, daß die Bindungsstelle einen wesentlichen Teil des Promoters darstellt, da sie alle für die Spezifität der Initiation benötigte Information enthält.

Die einfachste Interpretation der Ergebnisse führt zu der Vorstellung, daß Bindungsstelle und Initiationsstelle (das ist der DNS-Abschnitt, der bei Anlagerung des ersten Ribonukleosidtriphophats von der RNSpolymerase abgedeckt wird) genau identisch sind. Die stabile Bindung der RNSpolymerase an der Template-DNS ist demnach eine Funktion der Initiationsstelle, die in vitro durch Weglassen der Ribonukleosidtriphosphate erst in Erscheinung tritt. Diese experimentell mögliche Zergliederung der Gesamtreaktion in stabiles Binden und Initiieren durch Zugabe der Triphosphate erleichtert aber die Vorstellung über diese Vorgänge: So gesehen ist die stabile Bindung die direkte Vorbedingung der Initiation. Die Spezifität der Initiation ist durch die Spezifität der Bin-

dung vorgegeben. Die Asymmetrie der Transkription ist die unmittelbare Folge der Asymmetrie der Bindung. Nach dieser Vorstellung "wartet" die RNSpolymerase im Zustand des stabilen Komplexes mit ihrem aktiven Zentrum am Initiationspunkt nur auf die zum Kettenstart benötigten Ribonukleosidtriphosphate.

Diese einfachste Modellvorstellung der Identität von Bindungsstelle und Initiationsstelle stimmt gut mit anderen Ergebnissen überein: 1. Die beobachtete Oligo-G-Synthese (12), die auf Grund der Sequenz der pDNS (siehe unten) nur am tatsächlichen Initiationspunkt der Transkription denkbar ist, findet statt, ohne daß sich die Position der RNSpolymerase gegenüber dem fdRF-Template verändert, so daß als Initiationsstelle (iDNS) ein mit pDNS identisches, DNase-resistentes DNS-Fragment isoliert wird. 2. Die strenge Asymmetrie der Transkription ist schon bei der Bindung der RNSpolymerase an fdRF-DNS nachweisbar (11): Plus- und Minusstrang der pDNS haben unterschiedliche Länge, auch wenn ein Gemisch aus mehreren Bindungsstellen vorliegt.

In Abwesenheit der Ribonukleosidtriphosphate ist die Zerfallsgeschwindigkeit des RNSpolymerase-DNS-Komplexes sehr gering (12): $k = 5 \times 10^{-5}$ sec^{-1} bei 120 mM KCl, das heißt, es muß eine hohe Aktivierungsenergie für diesen Reaktionsschritt aufgebracht werden. Bei der Initiation der RNS-Synthese wird die Position der Bindungsstelle aber sehr schnell verlassen. Vermutlich stammt die treibende Kraft aus der freien Energie

der Nukleotidyltransferase-Reaktion bei der Verknüpfung der ersten Ribonukleosidtriphosphate.

Diese Vorstellung ist aber nur sinnvoll, wenn angenommen wird, daß der Ort der stabilen Bindung von der RNSpolymerase vor der Initiation nicht verlassen wird, daß also auch die molekularen Wechselwirkungen zwischen RNSpolymerase und DNS sowohl im Bindungskomplex als auch im Initiationskomplex (nach der Anlagerung des ersten Ribonukleosidtriphosphats) identisch sind, oder anders ausgedrückt, daß innerhalb der pDNS nicht zwei voneinander unabhängige Nukleotidsequenzen oder -muster vorhanden sind, die einerseits für die stabile Bindung, andererseits für die spezifische Initiation verantwortlich sind.

Die pDNS enthält in ihrer Nukleotidsequenz offenbar alle Information, die für die spezifische Initiation notwendig ist. Wegen dieser Autonomie des RNSpolymerase-pDNS-Komplexes könnte angenommen werden, daß die Bindungs- und Initiationsstelle mit dem Promoter identisch ist. Das steht aber im Widerspruch zu dem Befund von Blattner et al. (9), die für das N-Gen des Phagen λ eine Promotermutation außerhalb der Initiationsstelle lokalisieren konnten. Auch für den Phagen fd ist es nicht ausgeschlossen, daß außerhalb der Bindungsstelle weitere DNS-Bereiche für die Initiation der RNS-Synthese wichtig sind. Denn es ist bisher nicht gelungen RNSpolymerase in spezifischer Weise an isolierte pDNS zurückzubinden. Es ist deshalb denkbar, daß zusätzlich DNS-Bereiche auf Grund ihrer allgemeinen Struktur (Einfangregio-

nen) oder besonderen Sequenz für das "Finden" der Bindungsstelle verantwortlich sind. Unter diesen Voraussetzungen sind auch Promotermutationen im weiteren Umkreis der Bindungs- und Initiationsstelle zu erwarten.

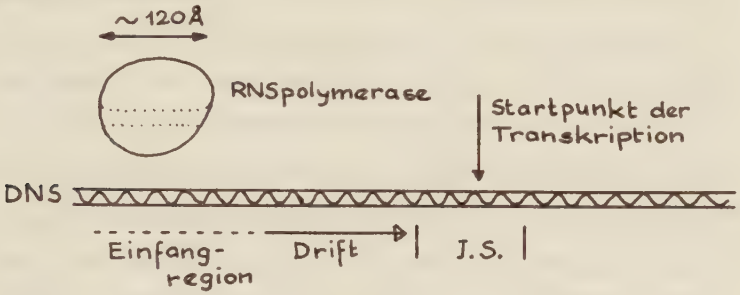
Die hier gelieferten Ergebnisse sprechen nicht gegen eine Drift der RNSpolymerase vor dem Erreichen der Initiationsstelle, widersprechen allerdings eindeutig dem von Blattner et al. (9) vorgeschlagenen Driftmodell: Danach würde die RNSpolymerase von der "entry region", die mit der Bindungsstelle gleichgesetzt wird, über eine Driftstrecke, möglicherweise in Triphosphat-abhängiger Reaktion, die Initiationsstelle erreichen.

Der Vergleich der pRNS-Sequenz mit der von Schaller (20) unabhängig davon ermittelten pDNS-Sequenz zeigt,

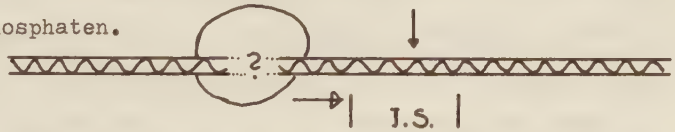
```
        5' TGCTTCTGACTATAATAGACAGGGTAAAGACCTGATTTTTGN
pDNS    3'  CGAAGACTGATATTATCTGTCCCATTTCTGGACTAAAA
pRNS    5'                          pppGUAAAGACCUGAUuu
```

daß die Transkription der pDNS etwa in der Mitte beginnt, entsprechend ist das aktive Zentrum der RNSpolymerase auch in der Mitte des Proteinmoleküls zu suchen. Der Minusstrang der pDNS wird fast bis zum Ende abgelesen. Gegen Ende der pRNS-Synthese ist in Bezug auf die Syntheserichtung vor dem aktiven Zentrum der RNSpolymerase keine DNS mehr vorhanden. Deshalb müssen die Bereiche der RNSpolymerase, die für die unspezifische Bindung an das Template während der Synthese verantwortlich sind, an ihrem "hinteren" Ende liegen.

Unsere Vorstellung von der Topologie der Promoterregion soll zusammenfassend durch das folgende Schema veranschaulicht werden:



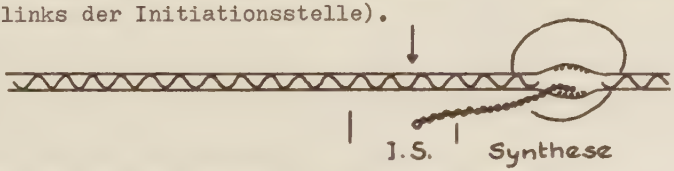
1. Unspezifische Bindung und Drift zur Bindungs- und Initiationsstelle (I.S.) unabhängig von Mg-Ionen und Ribonukleosidtriphosphaten.



2. Stabile Bindung an der Initiationsstelle (auch Mg- und Triphosphat-unabhängig), mit denaturiertem DNS-Bereich innerhalb des Komplexes;

Einfügen der ersten Ribonukleosidtriphosphate und

3. Initiation der RNS-Synthese (unabhängig von Promoterbereichen links der Initiationsstelle).



Verlassen der Initiationsstelle und RNS-Synthese.

Dieses Modell enthält als wesentliches Versuchsergebnis die Identität von Bindungs- und Initiationsstelle auf fdRF-DNS, und die Ergebnisse insbesondere für den Phagen λ (9), nach denen Promoterbereiche vor der Initiationsstelle notwenig sind, damit die RNSpolymerase diese Stelle erreichen kann. Es ist wahrscheinlich, daß die Mechanismen der Transkription für den Phagen und seinen Wirt E.coli prinzipiell gleichartig sind, weil jeweils das gleiche Enzym, die E.coli-RNSpolymerase diese Transkription durchführt. Neuere in vitro Versuche am lac-Operon von E.coli weisen darauf hin, daß auch hier innerhalb der RNSpolymerase-Bindungsstelle eine "pRNS" synthetisiert werden kann (W.Gilbert, pers. Mitteilung), das heißt auch in diesem System wird die Transkription innerhalb der Bindungsstelle gestartet.

5 MATERIAL UND METHODEN

5.1. Puffer

TE-Puffer war 10 mM Tris-Cl (pH 7.5), 0.1 mM EDTA.

Bindungspuffer war 20 mM Tris-Cl (pH 8.0), 10 mM $MgCl_2$, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM DTE, 5% Glycerin.

Denaturierungspuffer: 50 mM K_2HPO_4, 10 mM Tris, 0.1 mM EDTA, 0.9 M NaCl wurde mit etwa dem gleichen Volumen 100 mM NaOH, 10 mM Tris, 0.1 mM EDTA, 0.9 M NaCl auf pH 12.2 (20°C) titriert.

5.2. Material

Nitrocellulosefilter MF 15, 0.15 µ Porengröße waren von Sartorius Membranfiltergesellschaft, Göttingen.

Polyäthylenimin (PEI)-Cellulose-Dünnschichtplatten, Polygram PEI MN 300 waren von Macherey und Nagel, Düren; sie wurden, wie von Southern und Mitchel (21) beschrieben, durch aufsteigende Chromatographie gewaschen.

Röntgenfilme KODIREX, Entwickler LX 24 und Fixierbad AL 4 waren von Kodak.

Sephadex G 50, G 75 und DEAE-Sephadex A 25 war von Pharmacia, Uppsala, Schweden; Biogel A 5 m von Biorad, Richmond, Californien. Rifampicin war von CIBA, Basel.

Rinderserumalbumin (BSA) war von Behringwerke AG, Marburg.

Diäthylpyrocarbonat (DPC) war von E. Merck AG, Darmstadt.

Ribonukleosidtriphosphate, Desoxyribonukleosidtriphosphate und NAD waren von Boehringer, Mannheim.

5.3. Radioaktives Material

$H_3{}^{32}PO_4$, trägerfrei, $[^3H]$ UTP, 11 Ci/mmol bzw. 50 Ci/mmol,

und [^{3}H] GTP, 15 Ci/mmol waren von Amersham Buchler GmbH, Braunschweig.

$H_3{}^{33}PO_4$, trägerfrei, war von NEN Chemicals Corp., Boston, USA.

[γ^{32}P] ATP, [γ^{32}P] GTP und [γ^{33}P]ATP wurden durch enzymatischen Phosphataustausch aus den unmarkierten Triphosphaten und trägerfreiem radioaktivem Phosphat hergestellt: Maximal 10 mCi trägerfreies radioaktives Phosphat ($H_3{}^{32}PO_4$ bzw. $H_3{}^{33}PO_4$) wurde zur Trockne eingeengt und in alkalischem Tris-Puffer aufgenommen. Die Reaktion wurde in einem Volumen von 200 µl durchgeführt, in einer Lösung von ca. 50 mM Tris-Cl (pH 7.5 bis 8), 3 mM EDTA, 15 mM $MgCl_2$, 1 mM 3-Phosphoglycerat, 1 mM ATP (oder GTP), je 0.5 mg/ml Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase und 3-Phosphoglyceratkinase.

Nach 30 min bei 37°C wurde die Reaktion durch Hinzufügen von EDTA (50 mM) beendet, die Enzyme durch Erhitzen (1 min, 100°C) inaktiviert, 5 mM K_2HPO_4 hinzugefügt, die Lösung auf 2 ml 0.1 M $(NH_4)HCO_3$-Puffer (pH 8.6) verdünnt und auf eine DEAE-Sephadex A 25 Säule, äquilibriert mit 50 mM $(NH_4)HCO_3$-Puffer, aufgetragen. Mit einem Gradienten von 50 mM bis 500 mM des gleichen Puffers wurde das radioaktive ATP (oder GTP) getrennt von restlichem radioaktivem Phosphat von der Säule eluiert. Das Ammoniumcarbonat wurde durch mehrmaliges Einengen zur Trockne aus 50% alkoholischer Lösung entfernt. Das Triphosphat hatte eine spezifische Aktivität von maximal 8 x 10^{10} cpm/µmol, wurde bei einer Konzentration von 5 µM in 50% alkoholischer Lösung bei minus 20°C aufbewahrt und direkt vor Gebrauch wieder eingeengt.

[α^{32}P] ATP und [α^{32}P] UTP wurden enzymatisch über Phos-

phorylierung von Dinukleosidmonophosphaten mit γ^{32}P-markierten Triphosphaten von C.P. Gray synthetisiert und zur Verfügung gestellt.

5.4. Radioaktive Messungen

Radioaktive Proben wurden im Packard-Scintillationszähler gemessen. Die Methoden wurden ausführlich beschrieben (12): Fällung hochmolekularer Nukleinsäure mit Trichloressigsäure (TCA), das Zählen von filtergebundener Radioaktivität (nach TCA-Fällung oder Hybridisierung) in Toluolscintillator und das Messen von flüssigen Proben (nach Gelelektrophorese, Gelfiltration, Elution von PEI-Chromatogrammen) in Triton-toluolscintillator - oder auch ohne Scintillator unter Ausnutzung der Čerenkov-Strahlung.

5.5. Enzyme

.51 RNSpolymerase aus E.coli wurde bis zur DEAE-Cellulose-Fraktion nach der Methode von Burgess (22) gereinigt. Der Holoenzymanteil mit stöchiometrischem σ- Gehalt wurde auf einer DNS-Agarose-Säule von der Core-Polymerase abgetrennt (23). Abschließende Chromatographie über Biogel A 1.5 m lieferte ein über 95% reines Enzym.
RNSpolymerase-Coreenzym wurde aus diesem reinen Holoenzym durch Abtrennen der σ-Untereinheit auf Phosphocellulose (22) erhalten.

.52 DNSpolymerase I aus E.coli wurde nach der Methode von Jovin et al. (24) von H. Schaller isoliert. Die spezifische Aktivität betrug 9000 E/mg Protein. 1 E synthetisiert bei 37°C in 30 min 10 nmol(P) DNS an Poly-d(AT) als Template.

.53 Polynukleotidligase aus E.coli wurde im wesentlichen nach der Methode von Olivera und Lehmann (25) isoliert. Die spezifische Aktivität betrug 6000 E/mg Protein, gemessen als Ringschluß von $[^3H]d(TA)_x$-Oligomeren (14, 26) von 50 Nukleotiden mittlerer Kettenlänge. 1 E verwandelt in 1 min bei 37°C 1 pmol $d(TA)_x$-Oligomere in die ringförmige Exonuklease III-resistente Form.

.54 DNase I aus Rinderpankreas wurde von Worthington, Biochemical Corp., Freehold, N.J., erhalten, in einer Konzentration von 1 mg/ml in Bindungspuffer, 20 mM $CaCl_2$, gelöst und bei minus 20°C eingefroren.

.55 RNase. Ribonuklease A aus Rinderpankreas, Typ I-A, Protease-frei, war von Sigma, St. Louis, USA. Ribonuklease T_1, kristallin, war von Sankyo Co. Ltd., Tokyo, Japan. Beide Enzyme wurden in TE-Puffer bei minus 20°C eingefroren.

.56 Alkalische Phosphatase aus E.coli, elektrophoretisch rein, war von Worthington.

.57 Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase und Phosphoglyceratkinase waren von Boehringer. Die Kristallsuspensionen wurden abzentrifugiert und die Enzyme zu je 10 mg/ml in TE-Puffer, 50% Glycerin gelöst und bei minus 20°C aufbewahrt.

5.6 Nukleinsäuren

.61 fd-DNS wurde im wesentlichen nach der von H. Schaller (27) angegebenen Methode isoliert. An Stelle der Gleichgewichts-

zentrifugation im CsCl-Dichtegradienten wurden die fd-Phagen durch wiederholte Fällung mit Polyäthylenglykol (PEG 6000) gereinigt (28).

.62 Minus-fd-DNS wurde von H. Schaller zur Verfügung gestellt. Sie wurde durch Strangtrennung aus im Minusstrang 5-Bromuracil-dichtemarkiertem fdRF gewonnen (29).

.63 fdRF wurde ausgehend von fd-DNS in vitro mit Hilfe der beiden E.coli-Enzyme DNSpolymerase I und Polynukleotidligase synthetisiert (13, 14). Als Primer der DNS-Synthese werden dafür zu fd-DNS komplementäre Oligonukleotide (29) benötigt, die aus fdRF durch DNase-Verdau auf eine mittlere Kettenlänge von 15 Nukleotiden gewonnen wurden. Der fdRF-Syntheseansatz enthielt: 500 µM(P) fd-DNS, 50 mM Tris-Cl (pH 7.5), 7 mM $MgCl_2$, 100 mM KCl, je 250 bis 400 µM dATP, dGTP, dTTP und dCTP (radioaktiv markierte Triphosphate 200 µM), 20 µM NAD. Vor dem Hinzufügen von $MgCl_2$, Triphosphaten und NAD wurde die Lösung zur Hybridisierung der Oligonukleotide mit der fd-DNS für 5 min auf 45°C erwärmt. Die Reaktion wurde durch Zugabe der Enzyme DNSpolymerase, 50 E/ml, und Polynukleotid-ligase, 150 E/ml, gestartet und nach 2 bis 5 h bei 20°C mit EDTA, 20 mM, gestoppt.

Die Synthese von radioaktiv markiertem RF (und seine Isolierung) wurde mit Hilfe eines Filter-Tests (14) verfolgt, der auf der Resistenz der in beiden Strängen kovalent geschlossenen ringförmigen fdRF-DNS gegen alkalische Denaturierung beruht (30, 31). DNS des RF II-Typs und lineare DNS wird bei pH 12.2, 0°C, denaturiert und nach Neutralisation an

Nitrocellulose-Membranfilter (MF 15) gebunden, während der RFI-ähnliche fdRF durch das Filter läuft.
60 bis 70% der synthetisierten doppelsträngigen DNS war ringförmiger fdRF, wie auch durch Sedimentation im alkalischen Rohrzuckergradienten und durch Elektronenmikroskopie gezeigt werden konnte. Zur Reinigung wurde das Protein bei Raumtemperatur mit Phenol extrahiert und das Phenol durch Gelfiltration auf Sephadex G 50 wieder abgetrennt. Nach Konzentration der DNS-Lösung am Rotationsverdamper auf das Ausgangsvolumen, wurde der Puffer auf einer gut mit Denaturierungspuffer (pH 12.2, 0°C) equilibrierten Sephadex G 50-Säule ausgetauscht. Sofort nach der Elution von der Säule wurden die DNS-haltigen Fraktionen mit 1/4 Volumen 0.3 M KH_2PO_4 neutralisiert, und durch MF 15-Fitler (vorgewaschen mit TE-Puffer, 0.5 M NaCl) bei schwacher Saugkraft an der Wasserstrahlpumpe filtriert. Eine Doppellage von MF 15-Filtern (Ø 4.5 cm) war ausreichend für eine fdRF-Präparation ausgehend von 1 µmol (P) fd-DNS. Das fdRF-haltige Filtrat wurde auf eine Konzentration von 1 bis 2 µmol/ml (P) DNS eingeengt und auf einer Sephadex G 50-Säule in TE-Puffer gebracht. Das erhaltene fdRF-Präparat, 0.5 bis 1.0 µmol(P) fdRF pro ml, enthielt weniger als 10% lineare DNS bzw. RF mit Einzelstrangbrüchen als Verunreinigung.

.64 <u>pDNS, Plus- und Minusstrang.</u> pDNS wurde hergestellt wie beschrieben (11), denaturiert und mit einem Überschuß von fd-DNS hybridisiert. Nach Abtrennung des pDNS-Plusstranges durch Gelfiltration (Biogel A 5 m, TE-Puffer, 0.3 M NaCl) wurde das

Hybrid in 50 mM NaOH denaturiert und der pDNS-Minusstrang über Biogel A 5 m in TE-Puffer, 0.1 M NaCl (Vorlauf + 0.05 M NaOH) von der fd-DNS getrennt.

.65 Thymus-DNS aus Kalbsthymus und Hefe-RNS waren von Worthington.

.66 c-RNS, synthetisiert an fd-DNS als Template, wurde von C. Nüßlein (32) zur Verfügung gestellt.

5.7 RNS-Synthese und präparative Isolierung

.71 Vorinkubation und Synthese von RF-RNS, (-CTP)RNS und pRNS

fdRF (Nukleotidkonzentration(P) 250 bis 400 µM) wurde mit RNS-polymerase in Bindungspuffer, 120 mM KCl, 0.2 mg/ml BSA, 15 min bei 37°C vorinkubiert. Die Proteinkonzentration der RNSpolymerase entsprach einem Verhältnis von 2 Mol RNSpolymerase pro Mol fdRF (r=2). Dabei wurde zur Berechnung von r die Zahl von 12000 Nukleotiden für fdRF bei einer spezifischen Molextinktion von $\varepsilon(P)_{260}$ = 6700 der fdRF-DNS in TE-Puffer und ein Molekulargewicht der RNSpolymerase von 470 000 dalton zugrunde gelegt (vgl. auch Ref. 12).

Nach der Vorinkubation wurde zur Synthese von RF-RNS die Reaktion durch Zugabe einer auf 37°C erwärmten Lösung der Ribonukleosidtriphosphate ATP, GTP, UTP und CTP in Bindungspuffer bei einer Endkonzentration von 20 bis 100 µM gestartet. (-CTP)RNS wurde in gleicher Weise aber ohne Hinzufügen von CTP synthetisiert. Zur Synthese von pRNS wurde nach der Vorinkubation DNase I zu einer Konzentration von mindestens 20 µg/ml hinzugefügt. Nach 10 min bei 37°C wurden wie zur Synthese der

RF-RNS die Ribonukleosidtriphosphate zugegeben, während die DNase noch aktiv war.

.72 Sequenzheterogene RNS. Sie wurde unter den gleichen Bedingungen wie RF-RNS aber bei höherem RNSpolymerase/fdRF-Verhältnis (r=10) während 15-minütiger Inkubation bei 37°C synthetisiert.

.73 Alkoholfällung. Die RNS-Synthese wurde durch Hinzufügen von 50 mM EDTA beendet. Um die RNS von der Hauptmenge der Ribonukleosidtriphosphate abzutrennen, wurde das Reaktionsgemisch mit Ammoniumacetat-Puffer pH 5 (0.1 M) und Hefe-RNS (100 µg/ml) und schließlich mit 2.5 Volumen Äthanol versetzt. Nach 2 h bei minus 20°C wurde der RNS-haltige Niederschlag abzentrifugiert und in TE-Puffer aufgenommen.

.74 Präparative Isolierung von pRNS und RF-RNS zur Sequenzanalyse. Ausgehend von 120 oder 240 nmol(P) fdRF-DNS wurden pRNS und RF-RNS während der Synthese mit $[\gamma^{32}P]$ ATP und $[^3H]$ UTP in der Kette und zum Teil zusätzlich mit $[\gamma^{32}P]$ GTP am 5'-Ende radioaktiv markiert. pRNS wurde auch mit $[\alpha^{32}P]$ UTP und $[^3H]$ GTP markiert. Die spezifischen Aktivitäten der radioaktiven Triphosphate lagen in der Größenordnung von 3×10^9 bis 10^{10} cpm/µmol. Die Synthese von pRNS wurde nach 15 min, die von RF-RNS nach 30 sec beendet. Nach Äthanolfällung wurde die RNS auf einer Sephadex G 75-Säule in 10 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer, pH 8.6, gesättigt mit DPC, nach Größe fraktioniert. pRNS wurde dabei von den restlichen Triphosphaten, den kurzeren RNS-Ketten (rel. Mobilität 1.03 in der Gelelektrophorese) und einer geringen Menge etwas längerer Ketten abgetrennt. Von der RF-RNS wurde die

Hauptmenge der (langkettigen) RNS im Ausschlußvolumen abgetrennt, die kürzeren Ketten wurden rechromatographiert und Fraktionen verschiedener Kettenlänge im Bereich des Elutionsvolumens von pRNS gesammelt. Die RNS-haltigen Lösungen wurden mittels Gefriertrocknung eingeengt, und die Rückstände in TE-Puffer, 100 µg/ml Hefe-RNS, gelöst.

5.8 Charakterisierung der RNS-Synthese an fdRF als Template

.81 Asymmetrie der Transkription. 50 nmol(P) fdRF wurden in 250 µl Bindungspuffer, 120 mM KCl, mit 12.5 µg RNSpolymerase (entsprechend einem Molverhältnis von r=6 Polymerasemolekülen/fdRF) 15 min bei 37°C vorinkubiert. Die Synthese wurde durch Zugabe von weiteren 250 µl einer Lösung von ATP, GTP, CTP und [^{3}H] UTP (5×10^7 cpm/ µmol) im gleichen Puffer zu einer Endkonzentration von 300 µM aller vier Ribonukleosidtriphosphate gestartet. Nach 15 min bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von EDTA (50 mM) beendet. Die RNS wurde durch Phenolextraktion von Protein befreit. Überschüssige Ribonukleosidtriphosphate wurden durch Alkoholfällung von der RNS abgetrennt.

Die RNS wurde in Lösung unter folgenden Bedingungen mit Plus- und Minus-fd-DNS hybridisiert: 50 µl TE-Puffer, 0.3 M NaCl; 3 bis 4 µM(P) RNS; 60 µM(P) fd-DNS bzw. BU-dichtemarkierte Minus-fd-DNS; Inkubation 2 h bei 50°C. Zur Kontrolle wurde zu fd-DNS komplementäre c-RNS in gleicher Weise hybridisiert. Zur Bestimmung der hybridisierten RNS wurde das Hybrid an Nitrocellulose-Filter MF 15 gebunden, auf dem Filter mit RNase nachbehandelt und die Radioaktivität auf dem gewaschenen Filter bestimmt (32).

.82 Templateaktivität des fdRF. 10 nmol(P) fdRF, und zum Vergleich die gleiche Menge Kalbsthymus-DNS wurden in 50 µl Bindungspuffer, 120 mM KCl, mit 2.5 µg RNSpolymerase (Holoenzym) oder 2.0 µg RNSpolymerase-Coreenzym für 15 min bei 37°C vorinkubiert. RNS-Synthese wurde unter den oben (vgl. 5.81) angegebenen Bedingungen durchgeführt. 10 µl-Proben wurden zu verschiedenen Zeiten nach Start der Synthese mit TCA gefällt und die Radioaktivität im Niederschlag bestimmt.

.83 Startnukleotid bei niedrigem RNSpolymerase/fdRF-Verhältnis. 7.2 nmol(P) fdRF (20 µl) wurden in Bindungspuffer, 120 mM KCl, 0.2 mg/ml BSA mit RNSpolymerase (3 µl) im Molverhältnis r=0.5 bis r=15 vorinkubiert (15 min, 37°C). Die Ribonukleosidtriphosphate wurden in 10 µl des gleichen Puffers zugegeben zu einer Endkonzentration von 50 µM $[\gamma^{33}P]$ ATP, 50 µM $[\gamma^{32}P]$ GTP (spezifische Aktivität jeweils zwischen 1 x 10^9 und 5 x 10^9 cpm/µmol), 100 µM CTP und 100 µM $[^3H]$ UTP (10^7 cpm/ µmol). Nach 2 min Synthese wurde Rifampicin (1 µl) zu 4 µg/ml zugegeben. Die Reaktion wurde nach insgesamt 10 min Synthese durch TCA-Fällung gestoppt. Der Nullwert lag bei 0.3 mol $[\gamma^{33}P]$ ATP und 0.15 mol $[\gamma^{32}P]$ GTP pro mol fdRF. Der wechselseitige overlap der ^{32}P- und ^{33}P-Kanäle lag bei 10%. Zur Verbesserung der Korrektur wurden dieselben Proben vier Wochen später bei inzwischen verändertem Verhältnis der spezifischen Aktivitäten noch einmal gemessen.

5.9 Charakterisierung von pRNS

.91 Gelelektrophorese. Die Methode der Elektrophorese von Nukleinsäuren in 12-prozentigem Polyacrylamidgel mit Na-Acetat/Harn-

stoff-Puffer wurde ausführlisch beschrieben (12). Die in gefrorenem Zustand geschnittenen Gelscheiben wurden vor dem Messen der Radioaktivität für 30 min bei Raumtemperatur in 0.5 ml TE-Puffer, 0.1 M LiCl, 20 µg/ml Pankrease-RNase eingeweicht.

.92 Hybridisierung. Die Hybridisierung von pRNS wurde in 22 µl TE-Puffer, 0.9 M NaCl für 12 h bei 30°C (beginnend bei 45°C) durchgeführt, bei Strangkonzentrationen von 1.5 nM pRNS und 15 nM DNS. Die Proben wurden dann 10fach in TE-Puffer, 0.5 M NaCl verdünnt und auf eine Sephadex G 75-Säule im gleichen Puffer aufgetragen zur Analyse der Hybridisierungsprodukte.

.93 Startnukleotid. pRNS wurde während der Synthese (15 min, 37°C) mit [^{3}H]UTP, 50 Ci/mmol, und [γ^{32}P]GTP, 1.4 x 10^{10} cpm/µmol, bzw. [γ^{32}P]ATP, 1.7 x 10^{10} cpm/µmol, radioaktiv markiert. Nach Alkoholfällung wurde eine RNS-Menge, entsprechend 0.2 pmol fdRF-Molekülen im Syntheseansatz, mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert.

.10 Sequenzanalyse

.101 Trennung der Oligonukleotide.

.101.1 RNase Abbau. Die isolierte, in Träger-RNS-Lösung aufgenommene RNS (TE-Puffer, 100 µg/ml Hefe-RNS) wurde mit Pankreas-RNase, 5 µg/ml (33), oder T_1-RNase, 25 µg/ml, für 30 min bei 37°C inkubiert.

.101.2 Zweidimensionale PEI-Chromatographie. Die entstandenen Oligonukleotide wurden durch zweidimensionale Chromatographie auf PEI-Cellulose Dünnschichtplatten, 20 cm x 20 cm, getrennt. Es wurden als Laufmittel die von Mirzabekov und Griffin (19) angegebenen Lösungen benutzt, für die erste Dimension 1.4 M Li-formiat (pH 3.4), 7 M Harnstoff und nach Erreichen der halben Steighöhe 1.8 M Li-formiat, 7 M Harnstoff, für die zweite Dimension 0.7 M LiCl, 20 mM Tris-Cl (pH 8.0), 7 M Harnstoff (wobei die LiCl-Konzentration gegenüber der Vorschrift (19) etwas erniedrigt wurde). Das Material wurde links unten 2 cm vom Rand der Platte in einem Volumen von maximal 20 µl aufgetragen. Die 1. Dimension war von unten nach oben, die 2. Dimensio von links nach rechts.

Vor dem Transfer der Dünnschichtplatten in die Laufmitteltanks wurde bei beiden Dimensionen bis zu einer Höhe von ca. 3 cm Wasser vorlaufen lassen. Die Chromatographie wurde aufsteigend bei Zimmertemperatur durchgeführt und beendet, wenn die wässerige Phase den oberen Rand der Platte erreicht hatte. Nach dem Lauf in beiden Dimensionen wurde die noch feuchte Platte zum Entfernen des Laufmittels in 3 aufeinanderfolgenden Methanolbädern je 15 min gewaschen und anschließend getrocknet.

Die Platte wurde nach der zweidimensionalen Chromatographie mit radioaktiven Farbmarkern versehen und zur Autoradiographie auf Röntgenfilme aufgepreßt. Die Filme wurden je nach der Menge der aufgetragenen Radioaktivität bis zu 3 Tagen exponiert und dann entwickelt. Die Schwärzung des Filmes gab ein ungefähres Maß für die Stärke der ^{32}P-Markierung auf der PEI-Platte.

Die chromatographisch getrennten Oligonukleotide bildeten ein im Autoradiogramm sichtbar gewordenes Pattern (Muster).

Dieses Pattern ist nach Gesetzmäßigkeiten gebildet, die sich aus der Laufgeschwindigkeit der Oligonukleotide als Folge ihrer Größe und Basenzusammensetzung ergeben (19). Diese Gesetzmäßigkeiten wurden noch einmal kontrolliert, indem sequenzheterogene RNS mit verschiedenen Paaren von ^{32}P- und ^{3}H-markierten Triphosphaten markiert wurde, und die nach Pankreas-RNase- und T_1-RNase-Abbau entstehenden Patterns der Oligonukleotide analysiert wurden. Auf Grund dieser Ergebnisse ließ sich aus der relativen Lage der Flecken ein Urteil über die Summenformel der entsprechenden Oligonukleotide gewinnen (vgl. Bild 1, A und B).

Zur quantitativen Auswertung der Chromatogramme wurden die vom Autoradiogramm her bekannten Positionen der Oligonukleotide auf der Dünnschichtplatte markiert, die PEI-Cellulose an diesen Stellen ausgekratzt und durch Aufsaugen in einer Eppendorf-Pipettenspitze gesammelt (12). Das radioaktive Material wurde aus der PEI-Cellulose mit 3 x 200 µl 3 M Ammoniak eluiert, durch Absaugen der Ammoniak-Lösung am Wasserstrahlvakuum, so daß sie direkt in die Packard-Meßgläßchen hineintropfte.

.101.3 Chromatographie des Startoligonukleotids. Die zweidimensionale Chromatographie des Startoligonukleotids von (-CTP)RNS auf PEI-Cellulose wurde in gleicher Weise durchgeführt wie die Chromatographie der normalen RNase-Abbauprodukte (5.101.2), nur wurde als Laufmittel in der 1.Dimension 2 M HCOOH, 1.6 M LiCl und in der 2.Dimension 1.6 M LiCl, 7 M Harnstoff benützt.

Diese Methode lieferte mit bestimmten Chargen von Dünnschichtplatten nur stark verschmierte Flecken. Stattdessen wurde zur

Chromatographie der Startoligonukleotide eine eindimensionale Methode eingeführt:
Als Laufmittel diente: 1.5 M HCOOH, 1.2 M LiCl, 10 mM GTP, wobei das Schmieren durch den GTP-Zusatz verhindert wurde. Wegen der niedrigeren Ionenstärke mußte, um eine ausreichend große Laufstrecke der Startoligonukleotide zu erreichen, die Dauer der Chromatographie auf 4 bis 5 h verlängert werden, durch Anbringen eines Papierdochtes am oberen Rand der PEI-Platte.

Diese Methode wurde benutzt, um das Startoligonukleotid, das nach der zweidimensionalen Chromatographie der (normalen) Oligonukleotide am Auftragspunkt verblieb, in einem Nachlauf (3.Dimension) zu chromatographieren. Dazu wurde der Streifen am linken Rand der PEI-Platte, der den Startfleck enthielt (in Richtung 1.Dimension), abgeschnitten. Das übrige Chromatogramm wurde ausgewertet; auf den Streifen wurde links neben dem Auftragspunkt als Marker Pankreas-RNase-verdaute (-CTP)RNS aufgetragen und der Streifen in Richtung der 1.Dimension mit dem oben angegebenen GTP-haltigen Laufmittel chromatographiert.

5.102 Analyse der Oligonukleotide.

Zur weiteren Analyse der Oligonukleotide wurden diese mit 50 µl 30 % Triäthylammoniumcarbonat, pH 10, aus der PEI-Cellulose des Chromatogramms eluiert (34), durch Gefriertrocknung eingeengt und in TE-Puffer, 100 µl/ml Hefe-RNS, gelöst.

.102.1 Phosphatase. Zum Nachweis des 3'-terminalen, möglicherweise ^{32}P-markierten Phosphatrestes wurde eine Probe der Oligo-

nukleotid-Lösung mit alkalischer Phosphatase (100 µg/ml) für 5 min bei 37°C in 10 µl 20 mM Tris-Cl, pH 8.0, 0.1 mM EDTA, 5 mM $MgCl_2$, 200 µg/ml Hefe-RNS inkubiert, auf eine PEI-Dünnschichtplatte aufgetragen und eindimensional in 0.9 M LiCl als Laufmittel chromatographiert. Parallel wurde radioaktives $^{32}PO_4$ chromatographiert und von Phosphatase freigesetztes $^{32}PO_4$ autoradiographisch durch Vergleich der Laufstrecken nachgewiesen.

.102.2 Basenanalyse. Zur nearest-neighbour-Analyse wurden die Oligonukleotide in 10 µl 5% Piperidinlösung alkalisch hydrolysiert (19). Die entstehenden 2'(3')-Nukleosidmonophosphate wurden auf 20 cm langen PEI-Cellulose-Streifen eindimensional getrennt: in einem ersten Lauf mit 1 M CH_3COOH, dann nach Trocknen in einem zweiten Lauf 10 cm mit Wasser, gefolgt von 0.85 M LiCl bis zum Ende des Streifens. Die Mononukleotide werden dabei in der Reihenfolge (von unten nach oben) GMP, UMP, AMP, CMP aufgelöst. Sie wurden autoradiographisch lokalisiert und zur quantitativen Bestimmung (auch der ^3H-Markierung) ausgekratzt und eluiert.

.102.3 RNase. Zu Proben der Oligonukleotide wurde sequenzheterogene $[\alpha^{32}P]$ATP-markierte RNS zugegeben, etwa die gleiche Menge an Radioaktivität wie in der Probe schon an ^{32}P-Markierung vorhanden war. Diese Lösung wurde in 25 µl TE-Puffer, 100 µg/ml Hefe-RNS, mit einem Gemisch von Pankreas-RNase (2 µl/ml) und T_1-RNase (10 µg/ml) für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Abbauprodukte wurden auf 20 x 20 cm PEI-

Dünnschichtplatten zweidimensional getrennt, so wie es für die erste Trennung beschrieben wurde (vgl. 5.101), allerdings wurde für die 1. Dimension nur 1.4 M Li-formiat (pH 3.4), 7 M Harnstoff als Laufmittel benutzt. Das entstehende Pattern wurde wieder (wie oben beschrieben) autoradiographisch abgebildet und quantitativ ausgewertet. Es erschienen im Autoradiogramm drei Reihen von Flecken entsprechend den Oligonukleotiden A_xC, A_xU und A_xG, die mindestens bis zu den Tetranukleotiden gut getrennt waren, und auf Grund ihrer Position eindeutig identifiziert werden konnten. Um die aus dem Oligonukleotid stammende Markierung von dem aus der sequenzheterogenen RNS stammenden Untergrund zu unterscheiden, wurde bei der quantitativen Auswertung diese Untergrundmarkierung jeweils abgezogen. Sie wurde in einem Parallelversuch ausgehend von der gleichen Menge sequenzheterogener RNS bestimmt.

Zur Analyse des nach Pankrease-RNase-Abbau erhaltenen Startnukleotids wurde dieses nach Chromatographie in der 3. Dimension mit T_1-RNase (wie unter 5.101.1 beschrieben) weiter abgebaut. Die Produkte wurden auf 20 cm langen PEI-Streifen eindimensional mit 0.5 M LiCl, 20 mM Tris-Cl, pH 8.0, 7 M Harnstoff chromatographiert. Ihre Wanderungsgeschwindigkeit wurde mit den Pankreas-RNase-Abbauprodukten AU und U verglichen, die aus zweidimensionalen Chromatogrammen von $[\alpha^{32}P]$ ATP-markierter sequenzheterogener RNS eluiert worden waren. Die Position der T_1-RNase-Produkte wurde autoradiographisch festgestellt und ihre radioaktive Markierung quantitativ bestimmt.

5.11 Abkürzungen

A	Adenosin (auch für Adenosin-3'-Monophosphat)
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytidin (auch für Cytidin-3'-monophosphat)
CMP	Cytidinmonophosphat
cmp	counts pro Minute
CTP	Cytidintriphosphat
d-	desoxy- (z.B. dATP = Desoxyadenosintriphosphat)
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DPC	Diäthylpyrocarbonat
DEAE-	Diäthylaminoäthyl-
E	Enzymeinheit
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Äthylendiamintetraacetat
G	Guanosin (auch für Guanosin-3'-monophosphat)
GMP	Guanosinmonophosphat
GTP	Guanosintriphosphat
N	Nukleosid, allgemein für A, G, U und C; innerhalb von RNS-Nukleotidsequenzen und deren RNase-Abbauprodukten stellvertretend für das Nukleotid (Nukleosid-3'-monophosphat)
N ≠ A, U	N ungleich A und U (N steht für G und C)
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
p	Phosphatrest
PEI	Polyäthylenimin

r	RNSpolymerase/fdRF (mol/mol)
RF	Replikative Form
RNS	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
TTP	Tymidintriphosphat
TCA	Trichloressigsäure
U	Uridin (auch für Uridin-3'-monophosphat)
UMP	Uridinmonophosphat
UTP	Uridintriphosphat

6. LITERATUR

1. F. Jacob und J. Monod,
   J. Mol. Biol. 3, 318 (1961)

2. W. Epstein und J.R. Beckwith,
   Annual Review of Biochemistry 37, 673 (1968)

3. D. Hinkle und M. Chamberlin,
   Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol. 35,
   65 (1970)

4. D. Hinkle und M. Chamberlin,
   J. Mol. Biol. 70,157 (1972)

5. M. Sugiura, T. Okamoto und M. Takanami,
   Nature 225, 589 (1970)

6. E.K.F. Bautz, F.A. Bautz und J.J. Dunn,
   Nature 223, 1022 (1969)

7. G. Walter, W. Zillig, P.Palm und E. Fuchs,
   Europ. J. Biochemistry 3, 194 (1967)

8. F.R. Blattner, J.E. Dahlberg,
   Nature New Biology 237, 227 (1972)

9. F.R. Blattner, J.E. Dahlberg, J.K. Boettiger,
   M. Fiandt und W. Szybalski,
   Nature New Biology 237, 232 (1972)

10. R. Schäfer, W. Zillig und K. Zechel,
    Europ. J. Biochemistry 33, 201 (1973)

11. B. Heyden, C. Nüsslein und H. Schaller,
    Nature New Biology 240, 9 (1972)

12. C. Nüsslein,
    Doktorarbeit, Tübingen (1974)

13. M. Goulian und A. Kornberg,
    Proc. Nat. Acad. Sci. 58, 1723 (1967)

14. B. Heyden,
Biochemische Diplomarbeit, Tübingen (1970)

15. M. Takanami, T. Okamoto und M. Sugiura,
Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol.
35, 179 (1970)

16. M. Sugiura, T. Okamoto und M. Takanami,
J. Mol. Biol. 43, 299 (1969)

17. E. Jacob und P.H. Hofschneider,
J.Mol. Biol. 46, 359 (1969)

18. P. Botchan, J.C. Wang und H. Echols,
Proc. Nat. Acad. Sci. 70, 3077 (1973)

19. A.D. Mirzabekov und B.E. Griffin,
J. Mol. Biol. 72, 663 (1972)

20. H. Schaller,
in Vorbereitung

21. E.M. Southern und A.B. Mitchell,
Biochem. J. 123, 623 (1971)

22. R.R. Burgess,
J. Biol. Chem. 244, 6160 (1969)

23. C. Nüsslein und B. Heyden,
Biochim. Biophys. Res. Commun. 47, 282 (1972)

24. T.M. Jovin, P.T. Englund und L.L. Bertsch,
J. Biol. Chem. 224, 2996 (1969)

25. B.M. Olivera und I.R. Lehman,
Proc. Nat. Acad. Sci. 57, 1426 (1967)

26. B.M. Olivera, I.E. Scheffler und I.R. Lehman,
J. Mol. Biol. 36, 291 (1968)

27. H. Schaller,
J Mol. Biol. 44, 435 (1969)

28. U.R. Yamamoto, B.M. Alberts, R. Benzinger, L. Hawthorne und G. Treiber, Virology 40, 734 (1970)

29. W. Oertel und H. Schaller, FEBS Letters 27, 316 (1972)

30. H.S. Jansz, P.H. Pouwels und J. Schiphorst, Biochim. Biophys. Acta 123, 626 (1966)

31. P.H. Pouwels, J. van Rotterdam und J.A. Cohen, J. Mol. Biol. 40, 379 (1969)

32. C. Nüsslein, Biochemische Diplomarbeit, Tübingen (1969)

33. G.G. Brownlee und F. Sanger, J. Mol. Biol. 23, 337 (1967)

34. F. Sanger, G.G. Brownlee und B.G. Barrell, J. Mol. Biol. 13, 373 (1965)

Herrn Dr. Heinz Schaller und allen aus der von ihm geleiteten Arbeitsgruppe danke ich für ihr Interesse am Verlauf der Experimente und für ihre Beteiligung in Ratschlägen und Diskussionen an dieser Arbeit. Insbesondere möchte ich Frau Dr. Christiane Nüsslein für die kritische Beurteilung der Versuche und für ihre Ungeduld bei deren Fortgang danken. Herrn Schallers Nachsicht und Großzügigkeit waren mir in Zeiten, in denen die Ergebnisse auf sich warten ließen, eine große Hilfe.

Herrn Christopher P. Gray danke ich für die ^{32}P-markierten Ribonukleosidtriphosphate, die er synthetisierte und mir zur Verfügung stellte.

Lebenslauf

Am 29. September 1943 wurde ich als dritter Sohn des Ingenieurs Heinrich Heyden und seiner Ehefrau Elisabeth, geb. Koch, in Aschersleben geboren. Im Herbst 1950 kam ich in Schkopau bei Merseburg in die Schule. Neujahr 1951 verließ die Familie die Deutsche Demokratische Republik. Ich besuchte dann die Volksschulen in Rhynern (Westfalen) und in Wiesbaden, wo ich Ostern 1954 ins Gymnasium überwechselte. Dort machte ich im Frühjahr 1963 das Abitur im mathematisch-naturwissenschaftlichen Zweig. Im Sommersemester des gleichen Jahres begann ich in Mainz Chemie zu studieren und wechselte dann zum Sommersemester 1965 nach Tübingen zum Studium der Biochemie über. Die Diplomprüfungen legte ich im April 1966 und März 1967 (Vorprüfung 1. und 2. Teil) und im Herbst 1969 (Hauptprüfung) ab. Das Studium der Biochemie wurde mit der Diplomarbeit abgeschlossen, die ich bis September 1970 im Max-Planck-Institut für Virusforschung in der von Dr. H. Schaller geleiteten Arbeitsgruppe anfertigte. Sie hatte das Thema: "Enzymatische Synthese einer ringförmigen doppelsträngigen Desoxyribonukleinsäure" .

Während der weiteren Arbeit in der gleichen Arbeitsgruppe im Max-Planck-Institut für Virusforschung, Tübingen, von Ende des Jahres 1970 bis Anfang 1974 wurden die Experimente zu der vorliegenden Dissertation mit dem Titel: "Die Bedeutung der RNSpolymerase-Bindungsstelle für die Initia-

tion der RNS-Synthese" ausgeführt, unter der Anleitung von Professor Dr. A. Gierer und Dr. H. Schaller.

Meine akademischen Lehrer waren:

Bayer, Beermann, Bock, Bonhoeffer, Bünning, Dütting, Gierer, Hanack, Hausen, Henning, Klee, Kollath, Kortüm, Lingens, Metzner, Möhres, Mörike, Müller, Schaller, Schneider, Schramm, Seyffert, Strassmann, Weitzel und Zähner.